



Gabinete de Apoio à Investigação Científica,
Tecnológica e Inovação



12.º Workshop
Educação pela Ciência
Projectos de Investigação
Científica de Alunos
da FMUL

LIVRO DE RESUMOS

10 Dezembro 2009 | Edifício Egas Moniz | Anfiteatro 57
www.fm.ul.pt/educacao_ciencia



Programa “Educação pela Ciência”

A Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (FMUL) criou há 12 anos (ano lectivo de 1997/1998) o Programa “Educação pela Ciência”, com o objectivo de estimular o interesse e a prática de investigação científica, clínica ou básica, por alunos da pré-graduação.

O Programa “Educação pela Ciência”, coordenado pelo Gabinete de Apoio à Investigação Científica, Tecnológica e Inovação (GAPIC), tem assim permitido aos alunos participarem no delineamento e execução de um protocolo de investigação laboratorial ou clínica, integrados numa equipa de investigação de uma unidade da FMUL e orientados por um tutor.

A divulgação pública dos resultados dos trabalhos tem sido realizada num *workshop* anual que constitui um *fórum* de discussão e debate, aberto à participação de todos os alunos, docentes e investigadores.

Os trabalhos que agora se apresentam constituem o resultado dos projectos apoiados e financiados pelo 12.º Programa “Educação pela Ciência”, no qual participaram 52 alunos, envolvidos em 40 projectos de investigação, desenvolvidos em cerca de 20 unidades de investigação da FMUL, sob orientação de 47 tutores.

O Coordenador do GAPIC

Prof. Doutor João Ferreira

As bolsas de investigação atribuídas no âmbito do 12.º Programa Educação pela Ciência tiveram o apoio financeiro da Fundação Merck, Sharp & Dhome.

Índice

Página

- 9 | 027 **Reconstrução Tridimensional do Núcleo Accumbens Humano**
Daniel Neto - Instituto de Anatomia
- 11 | 006 **Caracterização quantitativa do núcleo basolateral da amígdala na esclerose mesial**
Ana Margarida Ferreira, Nuno Filipe Martins - Clínica Universitária de Neurologia
- 13 | 012 **Estudo do gene da “Vitamin D-Binding Protein (VDBP)” no DNA de doentes com esclerose lateral amiotrófica**
Maria Moitinho de Almeida - GenoMed (IMM)
- 15 | 037 **Proximidade por Telemetria para o Controlo de Compliance em doentes com ELA**
José Pedro de Almeida - Clínica Universitária de Medicina Física e Reabilitação
- 17 | 008 **Estudo da transposição da barreira hemato-encefálica por um anticorpo contra o vírus do dengue**
António Oliveira - Instituto de Bioquímica
- 19 | 034 **Miocardite aguda. Contributo da imagiologia cardíaca e dos índices inflamatórios, imunológicos e genéticos para avaliação dos mecanismos, diagnóstico e prognóstico**
Vanessa Alexandra de Carvalho, Miguel de Menezes, Raquel de Magalhães - Clínica Universitária de Cardiologia
- 21 | 033 **Prognóstico da Hipertensão Arterial pulmonar. Influência da Fibrose Miocárdica e da Função Ventricular Direita Avaliadas por Ressonância Magnética e Relação com Parâmetros Genéticos e de Inflamação**
Mário Rui Góis, André Vicente, Daniel Gomes - Clínica Universitária de Cardiologia
- 23 | 032 **Anomalias do septo interauricular no adulto jovem com acidente vascular cerebral criptogénico. Contributo para o estudo dos mecanismos, padrões, factores de risco e prognóstico**
João Eurico dos Reis, João Pedro Nobre, Gonçalo Envia - Clínica Universitária de Cardiologia
- 25 | 001 **O papel das células iNKT na patogénese do síndrome antifosfolípido**
Pedro Manuel Pereira - Unidade de Imunologia Celular (IMM)
- 27 | 039 **Mecanismos de resistência dos linfomas à imunoterapia mediada por linfócitos Tγδ**
Francisco Silva - Laboratório de Imunologia Molecular
- 29 | 013 **Determinação do papel de factores de transcrição sujeitos a repressão ao nível da tradução em Plasmodium berghei – as funções dos factores AP2 durante o desenvolvimento sexual do parasita nos estádios iniciais da fase do mosquito**
Ana Rita Batista Gomes - Unidade UPAMOL (IMM)
- 31 | 035 **Células endoteliais circulantes como marcadores de resposta à terapêutica no cancro da mama localmente avançado**
Catarina Barreiros Couto – Clínica Universitária de Cirurgia
- 33 | 014 **Caracterização epidemiológica e molecular de estirpes do complexo Bovis isoladas a partir do Homem em Portugal**
Fábio Medeiros - Instituto de Microbiologia
- 35 | 040 **Epidemiologia de infecções por SGB invasivas em adultos não grávidos em Portugal**
Domke Andreas - Instituto de Microbiologia

- 37 | 031 *Factores de adesão à terapêutica antibiótica numa população do concelho de Lisboa*
Rui Sérgio Neto Fernandes - Unidade de Epidemiologia (Instituto de Medicina Preventiva)
- 39 | 021 *Derivados Imidazolidin-4-one da Primaquina: o seu impacto na fase hepática da Malária*
Catarina de Almeida Marques - Unidade de Malária (IMM)
- 41 | 002 *Efeito de anti-CD4 não depletante em modelo animal com alergia nas vias respiratórias*
António Oliveira - Unidade de Imunologia Celular (IMM)
- 43 | 003 *O papel das membranas lipídicas na formação de partículas virais do vírus do Dengue*
David Samuel Sousa - Instituto de Bioquímica
- 45 | 004 *Avaliação da interação da polimixina B com LPS e modelos de biomembranas por potencial zeta*
Rita Inácio - Instituto de Bioquímica
- 47 | 005 *Estudo da interação fibrinogénio-eritrócito por espectroscopia de força utilizando um microscópio de força atómica*
Leonor Fernandes - Instituto de Bioquímica
- 49 | 007 *Estudo da interação da Polimixina B com sistemas membranares e lipopolissacárido*
Maria Luis de Barros e Sacras - Instituto de Bioquímica
- 51 | 009 *Efeito da interação RANK-RANKL e da expressão da MMP1 na capacidade invasiva in vitro de linhas celulares de cancro da mama e da próstata*
António Miguel de Carvalho, Rui Pedro Teixeira - Unidade de Investigação Aplicada em Oncologia Clínica (IMM))
- 53 | 010 *Caracterização Quantitativa do Gyrus Dentatus na Esclerose Mesial*
Edgar Miguel Moreira, André Branquinho - Clínica Universitária de Neurologia
- 55 | 011 *Estudo das diferenças entre os circuitos Notch de Inibição Lateral e Sincronização*
Joana Pires - Unidade de Desenvolvimento Embrionário de Vertebrados (IMM)
- 57 | 016 *Angioplastia de tronco comum não protegido – segurança e eficácia*
Rute Baeta Baptista - Instituto de Fisiologia
- 59 | 017 *Sobreposição de stents medicados com anti-proliferativo - Limus versus Paclitaxel*
Miguel Bigotte Vieira - Instituto de Fisiologia
- 61 | 018 *Efeitos da estimulação da insula e do hipotálamo posterior num modelo animal de acidente vascular cerebral (AVC)- desenvolvimento do modelo animal*
Filipe André Rodrigues - Instituto de Fisiologia
- 63 | 019 *Alterações Autonómicas por deficit de perfusão da artéria cerebral média*
David Samuel Sousa - Instituto de Fisiologia
- 65 | 020 *Caracterização molecular de complexos nucleares proteicos envolvidos no primeiro passo da biogénese de miRNA*
Andreia Sofia Forno - Unidade de Biologia Celular (IMM)
- 67 | 022 *Relação entre a eficácia terapêutica e as concentrações plasmáticas da ribavirina na hepatite C crónica*
Sofia Charro - Clínica Universitária de Gastroenterologia
- 69 | 023 *Variação Genética de Enzimas Relacionados com o Metabolismo do Óxido Nítrico e com o Processo Inflamatório na Insuficiência Renal Crónica*
Cláudia Isabel Penedo, Teresa Oliveira - Laboratório de Genética
- 71 | 024 *Influência de BRCA1 na actividade da cromatina mediada pela Topoisomerase II*
António Caetano - Unidade de Biologia da Cromatina (IMM)
- 73 | 025 *Mapeamento dos receptores dopaminérgicos (D1 e D2) do núcleo accumbens humano – dupla marcação com imunofluorescência*
Hugo Martins - Instituto de Anatomia
- 75 | 026 *Anatomia da Área Septal Pós-Comissural*
Maria Beatriz Mourato - Instituto de Anatomia
- 77 | 028 *Marcação simultânea por imunofluorescência dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 do Locus Ceruleus Humano*
Pedro Neves, Rafaela Sofia Campanha, Joana Helena Teixeira - Instituto de Anatomia
- 79 | 029 *Medição da Adesão à Terapêutica Anti-hipertensora: validão de método*
Ana Marta Coelho, Mariana Alves - Unidade de Epidemiologia (IMP)
- 81 | 030 *Identificação de hipertensos medicados nos cuidados de saúde primários - Comparação de métodos para amostragem*
Carlota Lavinias - Unidade de Epidemiologia (IMP)
- 83 | 036 *Validação molecular de possíveis reguladores do fenótipo de Senescência Acelerada*
Tiago dos Reis Matos - Unidade de Biologia da Cromatina (IMM)
- 85 | 038 *Avaliação da função autónoma humana após um AVC isquémico ao nível da artéria cerebral média*
Raquel Paixão, Ana Isabel Sousa - Instituto de Fisiologia
- 87 | 041 *O papel da re-inervação na regeneração da barbatana do peixe zebra*
Ding Zhang - Instituto de Medicina Molecular
- 89 | 4ª Bolsa de Investigação da Fundação Astra-Zeneca/Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa
Imunodeficiência Comum Variável: Patogénese da Activação Imunológica Crónica
Sara Branco Pereira da Silva - Unidade de Imunologia Clínica IMM/Serviço de Imunoalergologia do HSM

Alunos: Neto D.

Tutores: Martins S, Fiuza M

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Anatomia

Telefone: 21 790 66 75 **Fax:** 21 797 17 56 **E-mail:** ajgonfer@fm.ul.pt

Título: *Reconstrução tridimensional do Núcleo Accumbens Humano*

Palavras-Chave: *Núcleo accumbens, Neuroanatomia; Reconstrução tridimensional*

Fundamento: O Núcleo Accumbens (Acc) é uma estrutura do estriado ventral bem conhecida em roedores, mas mal identificada nos seres humanos.

Sabe-se que constitui uma interface limbico-motora e que está envolvido em alguns distúrbios neuropsiquiátricos, tendo-se tornado um alvo de neurocirurgia funcional estereotáxica para o tratamento das doenças referidas quando refractárias a terapêutica médica.

Trabalhos anteriores permitiram estabelecer as coordenadas estereotáxicas do Acc Humano, os seus limites e dimensões.

Para melhor esclarecer a sua forma e topografia, permitindo uma melhor visualização e identificação por neuronavegação, pretendeu-se efectuar a reconstrução tridimensional do Acc com base nos estudos de coordenadas estereotáxicas realizados previamente.

Objectivos: Reconstrução tridimensional do Acc Humano.

Métodos: Foram estudados 10 Acc do estudo estereotáxico previamente realizado, tendo sido seleccionados pela sua maior qualidade histológica e visualização das marcas de referência. As coordenadas foram determinadas na região claramente delimitável (metade posterior do Acc). Delimitou-se o contorno do Acc em cada lâmina digitalizada, com adaptação da mesma para um programa de desenho tridimensional. Foi analisada a variabilidade em cada plano dos diferentes núcleos e criado um modelo informático tridimensional.

Resultados: Os resultados estão de acordo com as conclusões do estudo prévio e permitem inferir que o Acc tem uma disposição paralela à linha média e ligeiramente descendente na direcção posterior. A sua maior expressão é subcomissural. Antero-posteriormente progride de uma forma globosa para uma forma mais achatada e côncava dorsolateralmente. O Acc atinge a sua maior largura a 5 mm e a maior altura a 1 mm anterior à comissura branca anterior.

Conclusões: O estudo efectuado permitiu definir a estrutura tridimensional da metade posterior do Acc e caracterizá-lo com maior rigor do ponto de vista anatómico.

Students: Neto D.

Tutors: Martins S, Fiuza M

Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Anatomia

Phone: 21 790 66 75 **Fax:** 21 797 17 56 **E-mail:** ajgonfer@fm.ul.pt

Title: *Three-dimensional reconstruction of the Human Nucleus Accumbens.*

Key-words: *Nucleus accumbens, Neuroanatomy, Three-dimensional Reconstruction*

Background: The Nucleus Accumbens (Acc) is a ventral striatum structure poorly identified in humans.

It's known that the Acc acts as a motor limbic interface and that it's involved in some neuropsychiatric disorders. It has recently become a target for stereotactic deep brain stimulation for some of those diseases, when refractory to medical treatment.

Previous studies have established the stereotactic coordinates of the Human Acc, it's limits and dimensions.

In order to clarify it's shape and topography, providing a better visualization and identification in neuronavigation procedures, it was our intention to make the three-dimensional (3D) reconstruction of the Acc, based in the previous stereotactic data.

Objectives: Three-dimensional reconstruction of the Human Acc.

Methods: Ten Human Acc from the previous stereotactic study were analysed, selected by their better histological quality and visualization of the reference marks. The coordinates where established in the posterior half of the Acc, the region where it's limits are clearly defined. The Acc outline was drawn on the digitised slices, converting the data to a 3D program. The variability in each plane of the different Acc was analysed, creating a 3D computer model.

Results: The results confirm the conclusions of the previous study and allowed to see that the Acc lies parallel to the midline and is slightly descendent caudally. It's main expression is subcomissural. From anterior to posterior it progresses from a globose to a more flat and dorsolateral concave shape. It's larger at 5 mm and higher at 1 mm ahead from the anterior commissure.

Conclusions: This study defined the 3D structure of the posterior half of the human Acc and allowed a more precise anatomical characterization of this nucleus.

Alunos: Ferreira A, Martins N.

Tutores: Pimentel J.

Laboratório, Centro ou Unidade: Laboratório de Neuropatologia do HSM

Telefone: **Fax:** **E-mail:**

Título: *Caracterização quantitativa da região basolateral da amígdala na esclerose mesial.*

Palavras-Chave: *Amígdala, Perda Neuronal, Anticorpo Antineuronal.*

Resumo estruturado: A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia focal na população adulta, sendo causada, em cerca de 65% dos casos, por esclerose mesial (EM), caracterizada pela perda neuronal e gliose astrocitária na camada piramidal do hipocampo (principalmente no sector CA1) invariavelmente, e na amígdala, quase sistematicamente[1],[2]. A cirurgia com remoção do hipocampo e amígdala lesados (amigdalohipocampectomia – AHC) é, portanto, uma forma de tratamento cada vez mais utilizada para esta patologia. Por razões diversas, no exame histológico da peça operatória, nem sempre é possível visualizar os diversos sectores do hipocampo, não se obtendo a confirmação de EM. Torna-se necessário, portanto, nos fragmentos teciduais, procurar estruturas microscópicas, fácil e frequentemente identificáveis. Uma dessas estruturas é a região basolateral da amígdala (RBLA), a qual, para além de ser a que está mais atingida neste processo, é facilmente identificada devido à sua proximidade com o epêndima[3].

Propomos um estudo retrospectivo de amígdalas de casos de AHC, com base na contagem de células neuronais da RBLA. Pretendemos, com efeito, definir um valor de perda de células neuronais a partir do qual seja possível o diagnóstico de EM, nos casos em que o sector CA1 não se encontra em condições de ser avaliado histopatologicamente, os denominados casos duvidosos.

Foram estudados 27 casos de amígdalas de AHC, divididos em 2 grupos: 20 casos de EM confirmados (CC) e 7 duvidosos (CD). As amígdalas de controlo – casos de controlo (CCr) foram obtidas de autópsias de indivíduos, sem patologia neurológica. Foram realizadas colorações de rotina pela Hematoxilina-Eosina (HE) e utilizou-se a técnica de imunocitoquímica para marcar o corpo celular dos neurónios recorrendo ao anticorpo antineuronal nuclear (NeuN). Procedeu-se à contagem neuronal de 6 campos de 40x de microscópio óptico (MO) por 2 observadores independentes, com a imunomarcção por NeuN para os CC e CD e, por enquanto, com a HE para os CCr (devido à dificuldade encontrada de marcação por NeuN nos CCr).

A média da contagem neuronal dos 2 observadores para os CC e os CCr não foi significativamente diferente. Desta forma, ainda não foi possível a avaliação estatística dos resultados obtidos para comprovar se os CD correspondem efectivamente a casos de EM.

O projecto encontra-se em desenvolvimento, sendo necessário ultrapassar as dificuldades acima referidas, bem como obter um maior número de CCr, a fim de alcançar resultados significativos e, conseqüentemente, atingir os objectivos propostos.

1. Johns, P.; Thom, M.; *Epilepsy and Hippocampal Sclerosis: Cause or Effect?*; ACNR, nº 5, Dez. 2008
2. WIESER, H.; *Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis*; *Epilepsia*, 45(6):695-714; 2004
3. AROUNIADOU-ANDERJASKA, V.; FRITSCH, B.; QUASHU, F.; BRAGA, M.; *Pathology and Patophysiology of the Amygdala in Epileptogenesis and Epilepsy*; *Epilepsy Res.*78(2-3): 102-116; Feb. 2008

Students: Ferreira A, Martins N.

Tutors: Pimentel J.

Laboratory, Centre, Unit: Laboratório de Neuropatologia do HSM

Phone:

Fax:

E-mail:

Title: *Quantitative characterization of basolateral region of amygdala in mesial sclerosis.*

Key-words: *Amygdala, Neuronal Loss, Antineuronal Antibody.*

Resumo estruturado:

Temporal Lobe Epilepsy (TLE) is the most common form of focal epilepsy in the adult population, being caused in about 65% of the cases by Mesial Sclerosis (MS). It is always characterized by neuronal loss and astrocytic gliosis in the pyramidal layer of hippocampus (particularly in subfield CA1), and frequently in the amygdala[1],[2]. Surgery with the removal of the damaged hippocampus and amygdala (Amygdalohippocampectomy – AHC) is a treatment which is being used more often for this pathology. Sometimes, in histologic examination of surgical tissue, it isn't possible to visualize all the subfields of the hippocampus, making the confirmation of MS impossible. So, it is necessary to look for microscopical structures that are frequently and easily identifiable in tecidual fragments. One of those structures is the basolateral region of amygdala (BLRA), which is not only the most damaged but also easily identifiable due to its proximity to ependyma[3].

We propose a retrospective study of amygdalas of AHC cases, based on counting neurons in BLRA. We would like to define a cut-off value of neuronal loss from which the diagnosis of MS is made possible in those cases where the subfield CA1 isn't in a condition to be histopathologically evaluated (uncertain cases).

27 cases of AHC amygdalas have been studied, which were divided into 2 groups: 20 certain cases (CC) of MS and 7 uncertain cases (UC). The control amygdalas – control cases (CrC) were obtained from autopsies of people without neurological pathology. Routine stainings were made with Hematoxylin-Eosin (HE) and the immunocytochemistry technique was used to detect the cellular bodies of neurons with antibody against Neuronal Nuclear Antigen (NeuN). 6 fields of 40x were counted in the optical microscope, by two independent observers, of NeuN stained neuronal cell bodies in CC and UC and, for now, with HE for the CrC (due to the difficulty in NeuN staining in CrC).

The neuronal counting mean of the 2 observers for the CC and CrC wasn't significantly different. Therefore, the statistical evaluation of the results to confirm the diagnosis of UC hasn't been possible.

The project is still in development, due to the fact that we have to overcome our difficulties, as well as obtain a greater number of CrC, in order to reach significant results and achieve the proposed objectives.

Alunos: Moitinho de Almeida M.

Tutores: Miltényi G, Mamede F.

Laboratório, Centro ou Unidade: Genomed, IMM

Telefone: 912814802

Fax: 217971756

E-mail: mariamoitinho@gmail.com

Título: *Estudo do gene da “Vitamin D-Binding Protein” (VDBP) no DNA de doentes com Esclerose Lateral Amiotrófica.*

Palavras-Chave: *Esclerose lateral amiotrófica, “Vitamin D-binding protein”, Proteómica.*

Fundamento: A Esclerose Lateral Amiotrófica é uma doença degenerativa que progride para a morte poucos anos após início dos sintomas. Cerca de 90% dos doentes têm a forma esporádica (não-familiar) da doença, os outros 10% têm uma forma familiar, quase sempre com transmissão autossómica dominante. Neste último caso vários genes têm sido identificados: SOD1, Alsina, VAPB, Senataxina, Dinactina e TDP-43.

A partir de estudos de proteómica recentes, foi identificada a presença predominante do haplotipo GC2, da “Vitamin D-Binding Protein”, num pequeno grupo de doentes com forma familiar.

A “Vitamin D-Binding Protein” é uma glicoproteína monomérica, multifuncional, polimórfica. Existem 3 polimorfismos comuns na estrutura da proteína, codificados por 3 alelos co-dominantes: GC1F, GC1S e GC2. Uma das mais interessantes propriedades desta proteína é a sua capacidade de actuar como “actin-scavenger”, prevenindo a acção tóxica da actina sobre a microcirculação.

Objectivos: Estudar as isoformas da “Vitamin D-Binding Protein” em doentes com Esclerose Lateral Amiotrófica e perceber se está, ou não, relacionada com esta patologia.

Métodos: O DNA de 91 doentes com Esclerose Lateral Amiotrófica (10 casos familiares e 81 esporádicos) foi extraído e o locus do gene da “Vitamin D-Binding Protein” foi amplificado pela técnica de PCR. Após o PCR, as amostras foram directamente sequenciadas. Amostras paralelas de 10 doentes saudáveis foram também sequenciadas como controlo.

Resultados: A frequência do alelo GC2 da VDBP foi de 8 (40%) nos casos familiares de Esclerose Lateral Amiotrófica e de 36 (22%) nos casos esporádicos. Nos controlos, esta frequência foi de 7 (35%). A frequência destes alelos no grupo de doentes com Esclerose Lateral Amiotrófica correspondia à previamente conhecida pela literatura.

Conclusões: Tem de se reconsiderar o papel exacto das altas concentrações de GC2 como factor de risco. São necessários mais estudos para saber se o aumento de GC2 está relacionado com com o desenvolvimento de Esclerose Lateral Amiotrófica.

Students: Moitinho de Almeida M.
Tutors: Miltényi G, Mamede F.
Laboratory, Centre, Unit: Genomed, IMM
Phone: 912814802 **Fax:** 21 797 17 56 **E-mail:** mariamoitinho@gmail.com

Title: *Study of the gene from Vitamin D-Binding Protein (VDBP) in the DNA from patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis.*

Key-words: *Amyotrophic lateral sclerosis, Vitamin-D binding protein, Proteomic.*

Background: Amyotrophic Lateral Sclerosis is a degenerative disease that progresses to death a couple of years after the first symptoms. 90% of the patients have the sporadic form of this disease, whereas the other 10% have a familiar form, generally with a dominant autosomic transmission. In this case, several genes have been identified as related to the disease: SOD1, Alsine, VAPB, Senataxin, Dinactin and TDP-43.

Some recent proteomic studies have identified the dominant presence of the GC2 isoform of the Vitamin D-Binding Protein, in patients with familiar ALS.

The Vitamin D-Binding Protein is a monomeric, multifunctional and polymorphic glycoprotein. There are 3 common polymorphisms in its structure, codified by three co-dominant alleles: GC1F, GC1S and GC2. One of this protein's most interesting properties is its capacity to act as an "actin-scavenger", preventing actin's toxic action on microcirculation.

Objectives: To study the isoforms of the Vitamin D-Binding Protein in ALS patients and to understand whether it is related to Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Methods: The DNA from 91 ALS patients (10 familiar and 81 Sporadic) was extracted and the locus corresponding to the Vitamin D-Binding Protein isoforms was amplified by PCR and direct sequencing. Parallel samples from 10 healthy individuals were investigated as controls.

Results: The frequency of the GC2 allele of the VDBP was 8 (40%) in the familiar ALS patients and 36 (22%) in the sporadic ALS patients. This frequency was in the range of the healthy individuals (7; 35%). The allele frequency of our patient groups was also in the range of that previously described in the literature.

Conclusions: The exact role of elevated GC2 concentrations as a risk factor in ALS has to be reconsidered. Whether this increase is playing a role in the development of ALS needs further investigations.

Alunos: Lopes de Almeida JP.
Tutores: Pinto AC.
Laboratório, Centro ou Unidade: Clínica Universitária de Medicina Física e de Reabilitação
Telefone: **Fax:** **E-mail:** jpedro.gla@gmail.com

Título: *Proximidade por Telemetria para o Controlo de Compliance em doentes com ELA.*

Palavras-Chave: *Esclerose lateral amiotrófica, Ventilação não-invasiva, Telemedicina.*

Fundamento: A Ventilação não-Invasiva (VNI) é um método eficiente no tratamento da insuficiência respiratória em doentes com Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Contudo, requer um processo de adaptação que nem sempre é atingido devido a fraca adesão. O papel da tecnologia actual, ao permitir uma «tele-monitorização» da VNI, ainda não está bem estabelecido.

Objectivos: Avaliar a adesão e a utilização dos cuidados de saúde, através do follow-up de doentes seguidos em consulta (*standard-based*), por um lado, e através de telecomunicações por modem (grupo de intervenção).

Desenho do estudo: Estudo controlado, observacional, prospectivo com colheita simultânea de dados.

População e Métodos: 40 doentes com ELA consecutivos e ventilados (em casa) foram aleatoriamente divididos em Grupo 1 (G1, n=20) cuja adesão e mudanças nos parâmetros do ventilador foram estudados durante consulta em ambuatório; e Grupo 2 (G2, n=20) cujos doentes receberam um modem conectado ao ventilador (Goodknight® 425ST).

Resultados: Não foram encontradas diferenças no início do estudo (baseline) relativamente às características clínicas e demográficas destes doentes. Apesar do maior trabalho inicial em termos de mudanças nos parâmetros do ventilador ($p=0,07$), o controlo remoto por modem permitiu acelerar o processo de adesão («full compliance», o número de dias necessário para atingir 6h de ventilação diárias) (ns). O rácio de incidência do número de consultas ($p=0,001$), urgências ($p=0,05$) e hospitalizações ($p=0,013$) foi significativamente menor no G2. A sobrevida média, avaliada pelo Log-rank test, mostrou ser maior no G2 desde o início dos sintomas ($p=0,036$).

Conclusões: Este estudo mostra que a tele-monitorização reduz a utilização dos cuidados de saúde, apesar da necessidade de um follow-up mais apertado inicialmente aquando da adaptação à VNI, com implicações na sobrevida e estado funcional.

Students: Lopes de Almeida JP.

Tutors: Pinto AC.

Laboratory, Centre, Unit: Clínica Universitária de Medicina Física e de Reabilitação

Phone: **Fax:** **E-mail:** jpedro.gla@gmail.com

Title: *Proximity with telemetry for the control of compliance in ALS patients.*

Key-words: *Amyotrophic lateral sclerosis, Non-invasive ventilation, Telemedicine.*

Background: Non-Invasive Ventilation (NIV) is an efficient method to treat respiratory failure in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) patients. However, it requires a process of adaptation not always attained due to poor compliance. The role of technology allowing telemonitoring of NIV compliance is not well established.

Objectives: To evaluate compliance and health care utilization, either with a close follow-up in office visits (standard-based care) or through modem communication plus office visits (intervention group).

Design: Observational, prospective single-blinded controlled trial with concurrent data collection. Population and methods: 40 consecutive and home-ventilated ALS patients were randomly assigned, to Group 1 (G1, n=20) whose compliance and ventilator parameters settings were assessed during office visits, and Group 2 (G2, n=20) if patients received a modem device connected to the ventilator (Goodknight ® 425ST).

Results: No differences at admission (baseline) regarding clinical and demographic characteristics. Despite the higher workload related to changes in ventilator parameters ($p=0,07$), remote control fastens the achievement of full compliance (days needed to achieve 6 hours of NIV use) (ns). The incidence rate ratio of the number of office visits ($p=0,001$), emergency room visits ($p=0,05$) and in-hospital admissions ($p=0,013$) was significantly lower in G2. Mean survival times evaluated with Log-rank test also revealed a prolonged survival from symptoms onset in G2 ($p=0,036$).

Conclusions: This study shows that telemonitoring reduces health care utilization despite a closer follow-up at initial stages of NIV adaptation with implications on survival and functional status.

Alunos: Oliveira A.

Tutores: Castanho M, Serrano I.

Laboratório, Centro ou Unidade: Unidade de Bioquímica Física (IMM)

Telefone: 21 799 94 83 **Fax:** 21 793 97 91 **E-mail:** aolivera.work@gmail.com

Título: *Estudo da transposição da barreira hemato-encefálica por um anticorpo contra o vírus do dengue.*

Palavras-Chave: *Barreira hemato-encefálica, Transposição, Dengue.*

Fundamento: A barreira hemato-encefálica (BHE) é formada por células dos capilares cerebrais que têm junções apertadas entre as células. Esta propriedade cria uma elevada resistência transendotelial ($2000-8000 \Omega \text{ cm}^2$) que faz com que a BHE seja permeável apenas a pequenas moléculas que entram no cérebro por difusão passiva entre as células (difusão hidrofílica) ou através das células (difusão lipofílica).

A Dengue é uma das doenças transmitidas por insectos mais frequentes no homem infectando cerca de 100 milhões de indivíduos anualmente. A infecção com qualquer um dos quatro serótipos do vírus causa dois síndromes bem definidos, a febre hemorrágica da dengue e a síndrome de choque da dengue, bem como uma vasta gama de respostas intermediárias e mesmo a ausência de resposta clínica. Os serótipos 2 e particularmente o 3 estão associados a manifestações neurológicas tal como encefalopatia, mielite, e a síndrome de Guillain-Barré. Embora a associação entre a infecção da dengue e manifestações neurológicas seja rara estas não devem ser subestimadas porque são difíceis de tratar e podem levar à morte ou a sequelas graves.

Objectivos: a) Estabelecer um modelo de barreira hemato-encefálica que reproduza as condições da barreira in vivo; b) Estudar a transposição do anticorpo contra o serótipo 3 do vírus da dengue usando este modelo.

Métodos: Os capilares do cérebro de bovino e astrócitos de ratos foram isolados para a construção do modelo da BHE. Os astrócitos de rato e as células endoteliais dos capilares do cérebro de bovino foram co-cultivados usando filtros transwell. Após 9 dias a resistência transendotelial foi medida e dois controlos fluorescentes foram adicionados ao lado apical de cada filtro transwell. Uma quantidade de solução foi periodicamente removida da base do filtro e a fluorescência quantificada no espectrofluorímetro. De seguida, a permeabilidade aparente dos controlos foi calculada.

Resultados: O isolamento dos capilares cerebrais bem como dos astrócitos foi bem sucedida. A cultura primária destas células permitiu a posterior manutenção de stocks por um longo período de tempo. As células foram observadas por microscopia para caracterizar a sua morfologia. A sua identidade foi confirmada por imunofluorescência com anticorpos contra a proteína ácida fibrilar da glia e o factor Von Willebrand. A resistência transendotelial obtida foi de apenas 136 Ohm. Tal como esperado a barreira foi mais permeável ao controlo positivo do que ao negativo.

Conclusões: Este modelo de BHE tem de ser optimizado de modo a reproduzir as condições observadas in vivo. Pretendemos aumentar a resistência transendotelial para esta ser mais similar à situação in vivo. De seguida o modelo pode ser usado para determinar a transposição de diferentes substâncias através das células. O presente estudo pode ajudar-nos a compreender melhor o transporte através da BHE, incluindo a transposição do anticorpo contra o serótipo 3 do vírus da dengue bem como a de fármacos importantes e a sua acção no Sistema Nervoso Central

Students: Oliveira A.

Tutors: Castanho M, Serrano I.

Laboratory, Centre, Unit: Unidade de Bioquímica Física (IMM)

Phone: 21 799 94 83 **Fax:** 21 793 97 91 **E-mail:** aoliveira.work@gmail.com

Title: *Study of the transposition of an antibody through the blood-brain barrier.*

Key-words: *Blood-brain barrier, Transposition, Dengue.*

Background: The blood-brain barrier (BBB) is formed by capillary endothelial cells which have tight junctions between cells. This property create a high electrical resistance interface (2000–8000 Ω cm²) that renders BBB permeable only to small molecules which enter the brain by passive diffusion between cells (hydrophilic diffusion) or through cells (lipophilic diffusion).

Dengue is one of the most prevalent insect-borne human diseases infecting about 100 million people every year. Infection with any of the four virus serotypes can cause two well-defined syndromes, hemorrhagic fever and dengue shock syndrome, as well as a wide range of intermediate responses, and even the absence of clinical response. Serotypes 2 and particularly 3 are associated with neurological manifestations such as encephalopathy, myelitis, and Guillain-Barré syndrome. Although the association between dengue infection and neurological manifestations is rare they should not be underestimated since they are difficult to treat and can lead to death or to serious sequels.

Objectives: a) To establish a BBB model which mimics the conditions of the barrier in vivo; b) To study the transposition of the antibody against dengue virus serotype 3 using this model.

Methods: Brain capillaries from bovine and rat astrocytes were isolated for the construction of the BBB model. Astrocytes from rat and endothelial cells from bovine brain capillaries were co-cultured using a transwell filter. After 9 days the transendothelial electrical resistance was measured and two fluorescent controls were added to the apical side of each transwell filter. An amount of solution was periodically removed from the base of the filter and the fluorescence quantified in the spectrofluorimeter. Then the apparent permeability of the controls was calculated.

Results: Brain capillaries and astrocytes were successfully isolated. Primary cultures of these cells allowed the further maintenance of stocks for a long period of time. The cells were observed by microscopy to characterize their morphology. Their identities were confirmed by immunofluorescence with antibodies against glial fibrillary acidic protein and Von Willebrand factor. The transendothelial electrical resistance obtained was only 136 Ohm. As expected the barrier was more permeable to the positive control than to the negative.

Conclusions: This BBB model must be optimized to reproduce the conditions observed in vivo. We intend to increase the transendothelial electrical resistance to approach the in vivo situation. Then we may use the model to determine the transposition of different substances through the cells. The present study may help us to better understand the transport across the BBB, including the transposition of the antibody against dengue virus serotype 3 as well as medically important drugs and their action in the CNS.

Alunos: Carvalho VA, Magalhães RP, Menezes MN.

Tutores: Almeida AG, Marques JS.

Laboratório, Centro ou Unidade: Clínica Universitária de Cardiologia

Telefone: 217805306 **Fax:** **E-mail:** anagalmeida@gmail.com

Título: *Miocardite Aguda. Contributo da Imagiologia Cardíaca e dos Índices Inflamatórios, Imunológicos e Genéticos para avaliação dos Mecanismos, Diagnóstico e Prognóstico.*

Palavras-Chave:

Fundamento: A miocardite é definida como inflamação do miocárdio. A apresentação clínica da doença é variável, incluindo desde sintomas não específicos até colapso hemodinâmico fulminante e morte súbita. Apesar da mortalidade e morbidade associadas à miocardite, não existem ainda guidelines para o seu diagnóstico e tratamento. As técnicas de imagiologia cardíaca (ecocardiografia e RMC) têm uma relevância crescente na abordagem do doente e poderão dar importante contributo para a compreensão da sua patogénese. O conhecimento da evolução temporal e espacial da inflamação e necrose miocárdica nestes doentes e a sua integração com os dados de marcadores inflamatórios sistémicos poderá ajudar a reconhecer os doentes em risco de progressão para disfunção cardíaca crónica (miocardiopatia dilatada).

Objectivos: Caracterização da miocardite na fase aguda em termos clínicos, laboratoriais (parâmetros inflamatórios e necróticos), electrocardiográficos (ECG) e imagiológicos (ecocardiografia e RMC) (Fase 1). Avaliação prospectiva da evolução temporal dos referidos parâmetros e identificação dos factores prognósticos (Fase 2).

População: Foram incluídos doentes consecutivos internados no Serviço de Cardiologia do HSM no período de 1 ano, com o diagnóstico de miocardite aguda, baseado na clínica, ECG e marcadores de necrose e após exclusão de doença coronária por cateterismo cardíaco.

Métodos: Foram avaliados: (1) sintomas de Insuficiência Cardíaca, (2) ECG: alterações da repolarização ventricular; (3) eco e RMC: função sistólica global e segmentar do ventrículo esquerdo, sendo analisada a fracção de ejeção e um score de contractilidade segmentar (SCS) (4) RMC: presença de edema e necrose miocárdica, sendo obtido um score segmentar de edema e de necrose (SSN) e ainda um índice de necrose (IN=massa de necrose/massa ventricular). (5) Bioquímica: níveis máximos de troponina, CK e CK-MB, NT-proBNP, PCR. Os doentes foram reavaliados segundo os mesmos parâmetros em vários períodos, segundo protocolo e ao longo de um ano, para detecção de disfunção ventricular e seus factores de prognóstico (Fase 2). Para análise estatística, utilizou-se o software SPSS 16,0.

Resultados: (Fase 1): Foram incluídos 22 doentes, com sintomas de precordialgia (54% de tipo opressivo). 95% apresentavam alterações electrocardiográficas, 50% dos quais revelaram supradesnívelamento do segmento ST (em 27% destes era generalizado). Todos os doentes evidenciavam elevação dos níveis de troponina (média de 16,9±29,8 ng/ml). 91% dos doentes apresentavam elevação da PCR (média de 4,6±4,5 mg/dl). A RMC revelou alterações em todos os doentes, revelando hipocinésia segmentar em 78,6% e edema e necrose, igualmente segmentares, em 100%. Foi encontrada correlação significativa entre: NTproBNP e SCS (R=0,728, p=0,026); NTproBNP e IN (R=0,726, p=0,041); Fracção de Ejeção e SCS (R=-0,672; p= 0,047); Fracção de Ejeção e IN (R=-0,737;p=0,023); CK e SSN (R=-0,577;p=0,031); CKMB e PCR (R=0,481;p=0,027).

Conclusões: Na nossa população, a RMC revelou-se um importante meio de diagnóstico para esta patologia, permitindo detectar inflamação e necrose miocárdicas e disfunção ventricular, que se correlacionou significativamente com os biomarcadores séricos. O significado de prognóstico destes achados será investigado na segunda fase deste projecto.

Students: Carvalho VA, Magalhães RP, Menezes MN.

Tutors: Almeida AG, Marques JS.

Laboratory, Centre, Unit: University Clinic of Cardiology

Phone: 21805307

Fax:

E-mail: anagalmeida@gmail

Title: *Acute Myocarditis. Cardiac Imaging, Inflammation, Immunology and Genetic markers contribution to assessment of pathophysiology, diagnosis and prognosis.*

Key-words: *Acute myocarditis, Imaging, Prognosis.*

Background: Myocarditis is defined as an inflammation of myocardium. Clinical presentation varies from unspecific symptoms to fulminant hemodynamic collapse and sudden death. Despite high mortality and morbidity, there are currently no guidelines regarding its diagnosis and treatment. Cardiac imaging (echocardiography and MRI) have had increasing importance on assessing the patient and may, in the future, play an important role towards establishing the pathophysiology of this disease. Integrating both temporal and spatial evolution of myocardium inflammation and necrosis with systemic inflammatory markers data may help recognize those patients at risk of progressing to chronic heart failure (Dilated Cardiomyopathy).

Objectives: Analysis of the acute phase of myocarditis in clinical, laboratory (inflammatory and necrotic markers), electrocardiography (ECG) and imaging (echocardiography and MRI) patterns (phase 1). Prospective evaluation of the temporal evolution of the previous parameters and identification of prognosis factors (phase 2).

Population: Patients with acute myocarditis admitted to the Cardiology Ward of Hospital de Santa Maria throughout a 1 year period were included. Diagnosis was based on clinical presentation, ECG, necrosis markers and exclusion of coronary disease by coronary angiography.

Methods: In all patients, we evaluated: (1) heart failure symptoms; (2) ECG: ventricular repolarization abnormalities; (3) Echo and MRI: global and segmental left ventricle (LV) systolic dysfunction, obtained by ejection fraction and segmental contractility score (SCS); (4) MRI: myocardium edema and necrosis, classified by a segmental edema score and a necrosis score (SNS) and a Necrosis Index (NI=necrosis mass/ventricular mass); (5) Biochemical Tests: maximum levels of troponin, CK, CK-MB, NT-proBNP, CRP. To assess LV dysfunction and prognostic factors, patients were reevaluated using the same parameters during a 1 year period, according to a protocol (phase 2). Statistical analysis was carried out using SPSS 16.0 software.

Results: (phase 1): 22 patients were included, presenting with chest pain (54% oppressive-like). 95% showed electrocardiography abnormalities, 50% with an elevated ST segment (27% of those had a global ST segment elevation). All patients had high levels of troponin, with an average of $16,9 \pm 29,8$ ng/ml. High CRP levels were present in 91% of patients, with an average of $4,6 \pm 4,5$ mg/dl. MRI scans showed abnormalities in all patients, 78,6% of which had reduced segmental contractility and 100% had segmental edema and necrosis. We found a statistically significant correlation between: NTproBNP and SCS ($R=0,728$, $p=0,026$); NTproBNP and NI ($R=0,726$, $p=0,041$); Ejection fraction and SCS ($R=-0,672$; $p=0,047$); Ejection Fraction and NI ($R=-0,737$; $p=0,023$); CK e SNS ($R=0,577$; $p=0,031$); CKMB e PCR ($R=0,481$; $p=0,027$).

Conclusions: In our study, MRI was an important diagnostic tool in our population, allowing the detection and quantification of the amount of inflammation, necrosis and LV dysfunction, all of which correlated significantly with serum biomarkers. The prognosis value of these findings will be investigated on phase 2 of this Project.

Alunos: Gomes DC, Góis MR.

Tutores: Almeida AG, Marques JS, Martins S.

Laboratório, Centro ou Unidade: Clínica Universitária de Cardiologia

Telefone: 217805306

Fax:

E-mail: anagalmeida@gmail.com

Título: *Prognóstico da Hipertensão Arterial pulmonar. Influência da Fibrose Miocárdica e da Função Ventricular Direita Avaliadas por Ressonância Magnética e Relação com Parâmetros Genéticos e de Inflamação.*

Palavras-Chave: *Hipertensão pulmonar, Prognóstico, Ventrículo direito*

Fundamentos: A hipertensão arterial pulmonar (HAP) representa um conjunto heterogéneo de doenças com prognóstico variável mas elevada mortalidade que parece associar-se a uma disfunção progressiva do ventrículo direito (VD). A morte parece ser devida a disritmias, não estando esclarecidos os seus mecanismos, nomeadamente se a disfunção ventricular e a fibrose miocárdica têm um papel. Contudo, a avaliação da função do VD por ecocardiografia convencional é limitada devido à complexidade da sua geometria. O advento recente dos métodos de deformação miocárdica (DM) obtidos por ecocardiografia assim como a estimativa da fibrose miocárdica por ressonância magnética (RM) fornecem nova informação sobre o VD, não estando determinada a sua utilidade na HAP. O péptido natriurético cerebral tipo B (BNP), que tem sido correlacionado com variáveis hemodinâmicas, é sugerido como marcador de disfunção do VD.

Objectivos: Estudar prospectivamente o valor de parâmetros de ecocardiografia convencional, de DM e RM na avaliação da disfunção do VD e estimar a relação classe funcional com níveis de NT-proBNP, em doentes com HAP. Na fase II do estudo, após 1 ano de seguimento, pretender-se-á identificar factores com influência prognóstica.

Métodos: Incluímos 24 doentes consecutivos com HAP (classe I WHO) avaliados em Consulta de Hipertensão Pulmonar entre Jan e Set de 2009. Na altura da inclusão, todos os doentes realizaram a seguinte avaliação: classe funcional (NYHA); electrocardiograma - ritmo, alterações da onda P, presença de hipertrofia ventricular e de perturbações da condução; ecocardiograma – dimensões do VD (área e volume 3D), deslocamento sistólico do plano do anel tricúspide, encurtamento fraccional da área do VD, pressão sistólica da artéria pulmonar, fracção de ejeção do VD (FEVD), índices de deformação e velocidade longitudinal da parede livre basal e média nos picos sistólico e diastólicos por speckle tracking; RM – presença e extensão de fibrose miocárdica; bioquímica – NT-proBNP, PCR. A análise estatística foi realizada em SPSS 17.0.

Resultados (preliminares): Na avaliação basal, do total dos 24 doentes estudados, 42% encontravam-se em classe II, 50% em classe III e 8% em classe IV. O ECG revelou bloqueio de ramo direito (completo ou incompleto) ou hipertrofia ventricular direita em 9 doentes. Os níveis de NT-proBNP médios foram de $2563,2 \pm 4782,5$ pg/mL, sendo normais em apenas 3 doentes. A população apresentou uma PSAP média estimada de $82,63 \pm 17,7$ mmHg. Os níveis de NT-proBNP correlacionaram-se positivamente com a classe funcional ($p<.05$), velocidade longitudinal do VD no pico diastólico A ($p<.05$), deformação longitudinal do VD no pico sistólico ($p<.05$) e negativamente com a FEVD ($p<.05$). Dos doentes que efectuaram RM, todos apresentaram fibrose da parede livre do VD, cuja extensão não se relacionou com a fracção de ejeção.

Conclusões: Os resultados revelam que o NT-proBNP apresenta uma boa correlação com a classe funcional e com os índices de DM, a qual se traduz numa maior capacidade destes na detecção de disfunção do VD face aos índices de ecocardiografia convencional, não se estabelecendo a relação com a fibrose miocárdica. A análise de factores de prognóstico será realizada na fase II do estudo.

Students: Gomes DC, Góis MR.

Tutors: Almeida AG, Marques JS, Martins S.

Laboratory, Centre, Unit: University Clinic of Cardiology

Phone: 217805306

Fax:

E-mail: anagalmeida@gmail

Title: *Prognosis of pulmonary arterial hypertension: Influence of myocardial fibrosis and right ventricle function assessed by magnetic resonance imaging and relation with genetic and inflammatory parameters.*

Key-words: *Pulmonary hypertension, Prognosis, Right ventricle.*

Background: Pulmonary arterial hypertension (PAH) represents a spectrum of diseases with variable prognostic but high mortality which associates with progressive dysfunction of right ventricle (RV). Mortality seems to be caused by dysrhythmias, but its mechanisms are not completely understood, particularly the influence of myocardial fibrosis and ventricular dysfunction. However, assessment of RV function using conventional methods is often difficult due the complexity of RV anatomy. Recently, myocardial strain methods by echocardiography and myocardial fibrosis estimation by magnetic resonance imaging (MRI) have been providing new information about RV, yet its importance in PAH is still unknown. Analytical parameters have also been suggested, namely brain natriuretic peptide type B (BNP) which has shown good correlation with hemodynamic variables.

Objectives: To study prospectively the importance of echocardiographic and MRI assessment of RV dysfunction and investigate the correlation between functional class and NT-proBNP, on PAH patients. In a later phase II, after a 1 year follow-up, we aim to identify factors with prognostic significance.

Methods: We enrolled 24 consecutive PAH patients (class I WHO) assessed at a Pulmonary Hypertension Center between January and September 2009. At baseline, all patients performed the following: functional class assessment (NYHA classification); electrocardiogram – rhythm, P wave abnormalities, RV hypertrophy and conduction defects; echocardiogram – RV dimensions (area and 3D volume), tricuspid annular plane systolic excursion, RV fractional area change, pulmonary arterial systolic pressure, RV ejection fraction, basal and mid RV free wall longitudinal strain and velocity indices by speckle tracking; MRI – presence and extension of myocardial fibrosis; biochemical assessment – NT-proBNP and PCR. Statistical analysis was performed with SPSS.

Results (preliminary): At baseline, among the 24 patients enrolled, 42% were in NYHA class II, 50% in class III and 8% in class IV. EKG showed right bundle branch block (complete or incomplete) or right ventricular hypertrophy in 9 patients. The average mean plasma levels of NT-proBNP were 2563.2 ± 4782.5 pg / mL and were normal only in 3 patients. Population showed a mean PASP estimated at 82.63 ± 17.7 mmHg. Levels of NT-proBNP positively correlated with functional class ($p < 0.05$), RV longitudinal velocity at diastolic peak A ($P < 0.05$), RV longitudinal strain at systolic peak ($p < 0.05$) and negatively correlated with ejection fraction ($p < 0.05$). All patients who were submitted to MRI showed RV free wall fibrosis, whose extension was not related to ejection fraction.

Conclusions: Our results show that NT-proBNP correlates well with functional class and strain parameters assessed by echocardiography, which were superior in the assessment of RV function compared with conventional echocardiographic indices. Relation to myocardial fibrosis was not found. Prognostic significance of these and other parameters will be evaluated later in phase.

Alunos: Envia GM, Reis JE, Nobre JP.

Tutores: Almeida AG, Cortez-Dias N.

Laboratório, Centro ou Unidade: Clínica Universitária de Cardiologia, FMUL

Telefone: 964402216

Fax: 217818899

E-mail: anagalmeida@gmail.com
gmenvia@gmail.com

Título: *Anomalias do septo interauricular no adulto jovem com acidente vascular cerebral criptogénico. Contributo para o estudo dos mecanismos, padrões, factores de risco e prognóstica.*

Palavras-Chave: *Acidente Vascular Cerebral, Anomalias do Septo Interauricular, Risco Cardiovascular*

Fundamento: Os acidentes vasculares cerebrais isquémicos (AVC) em adultos jovens constituem uma patologia rara, mas relevante, pela sua morbilidade. Em muitos destes casos, não é identificável a etiologia, mesmo após investigação exaustiva - AVC criptogénico. Em estudo prévio, detectámos a associação do AVC criptogénico às anomalias do septo interauricular (ASA), particularmente entre os doentes mais jovens (≤ 35 anos).

Objectivos: Caracterizar padrões e identificar possíveis factores clínicos, genéticos, inflamatórios, procoagulantes preditores de ocorrência e recorrência de AVC criptogénico em adultos jovens com ASA.

Métodos: População: Amostra consecutiva de doentes (dts) ≤ 55 anos com AVC isquémico clinicamente criptogénico, admitidos entre 2002 e 2007. Métodos: Todos os dts foram avaliados por ecocardiografia transesofágica para pesquisa de ASA, sendo também analisadas na fase aguda do AVC as seguintes variáveis: factores de risco (FR) de aterosclerose (HTA, diabetes, dislipidémia, tabagismo); exames laboratoriais – perfil de coagulação, homocisteína, fibrinogénio, Antitrombina III, Proteína C e S funcionais e perfil Lipídico (razão Colesterol Total/HDL); ecocardiograma transtorácico. Iniciou-se a avaliação da recorrência do AVC após um ano.

Resultados: A população incluiu 197 dts, com $43,9 \pm 7,9$ anos, 116 (59,9%) do sexo masculino. 109 dts (55,33%) tiveram AVC criptogénico. Entre os doentes com AVC criptogénico, 73,4% (N=80) tinham FR, aumentando essa prevalência com a idade (≤ 35 : 44,4%; 36-45: 68,4%; 46-55: 86,8%; $p=0,001$). 75 dts (38%) apresentavam ASA, mas essa prevalência dependeu do grupo etário (≤ 35 : 88,9%; 36-45: 44,7%; 46-55: 37,7%; $p < 0,001$). A ASA mais frequente foi o foramen ovale permeável (FOP, n=58). Os dts sem ASA possuíam níveis de fibrinogénio mais elevados (391 ± 135 mg/dL vs 334 ± 89 mg/dL $p=0,019$). Os doentes com AVC criptogénico apresentaram níveis mais elevados de homocisteína (15 ± 17 μ g/dL vs 10 ± 3 μ g/dL; $p=0,032$) do que o grupo com AVC não criptogénico, e menos elevados de fibrinogénio (363 ± 118 mg/dL vs 403 ± 102 mg/dL; $p=0,017$). Não foram detectadas diferenças significativas quanto aos restantes parâmetros. Durante o período de seguimento, os resultados preliminares de 23 dts, revelaram recorrência do AVC em 3.

Conclusões: Entre os dts com AVC criptogénico, as ASA são mais relevantes nos indivíduos mais jovens em oposição aos FR convencionais e marcadores protrombóticos que assumem maior preponderância entre os grupos etários mais avançados. A ocorrência de AVC criptogénico nos dts ASA não parece estar associada a marcadores protrombóticos. Estão ainda em estudo outros factores de risco morfológicos, funcionais e genéticos, que poderão contribuir adicionalmente para o esclarecimento dos mecanismos subjacentes.

Students: Envia GM, Reis JE, Nobre JP.

Tutors: Almeida AG, Cortez-Dias N.

Laboratory, Centre, Unit: Cardiology University Clinic, FMUL

Phone: 964402216 **Fax:** 217818899 **E-mail:** anagalmeida@gmail.com
gmenvia@gmail.com

Title: *Atrial septum abnormalities in young adults with cryptogenic stroke. Mechanisms, patterns, risk factors and prognosis.*

Key-words: *Stroke, Atrial septum abnormalities, Cardiovascular risk.*

Background: Stroke in young adults (≤ 55 yo) is rare but relevant due to its high morbidity. Despite exhaustive investigation, in several cases is not possible to establish an etiological cause (cryptogenic stroke (CS)). In a previous study we learned that cryptogenic stroke patients have an unusually high prevalence of atrial septum abnormalities (ASA) specially in the youngest patients (≤ 35 yo).

Objectives: Identify laboratorial patterns and occurrence and recurrence of CS predictive factors (clinical, genetic, inflammatory and prothrombotic) in young adults with ASA.

Methods: Population: Our study included stroke patients (pts) younger than 55yo admitted between 2002 and 2007. Methods: Every patient was assessed by Transesophageal Echocardiography (TEE) for ASA. We also analyzed atherosclerotic risk factors (RF) (HBP, Diabetes, Dyslipidemia, Tabagism), laboratorial findings – Clotting profile, Homocysteinemia, Fibrinogen, Antithrombin III, functional C and S proteins, lipid profile (Cholesterol/HDL ratio) and Transthoracic Echocardiogram, during the stroke's acute phase. We began analysis of recurrence one year after stroke.

Results: 197 pts were included, with an average age of 43.9 ± 7.9 yo, 59.9% (N=116) male. 55.33% (N=109) pts had CS. 73,4% (N=80) of these pts had RF, which increased with age (≤ 35 yo: 44.4%; 36-45yo: 68.4%; 46-55yo: 86.8%, $p=0.001$). 38.1% (N=75) of the population had ASA and the prevalence decreased with age group (≤ 35 yo: 88.9%; 36-45yo: 44.7%; 46-55yo: 37.7%, $p<0.001$). Patent Foramen Ovale (PFO) was the most frequent ASA (29.4%; N=58). Pts without ASA had higher Fibrinogen levels ($390,56 \pm 135,09$ mg/dL vs $333,80 \pm 88,69$ mg/dL, $p=0,019$). Pts with CS presented higher levels of Homocysteine (15.09 ± 17.26 μ g/dL vs 10.44 ± 3.34 μ g/dL, $p=0.032$) than the group without CS, and lower levels of Fibrinogen (363.10 ± 117.89 mg/dL vs 402.64 ± 101.70 mg/dL, $p=0.017$). There were no significant differences in the remaining analytical variables studied. On the follow-up analysis, the preliminary results of 23 pts showed that stroke recurrence occurred in 3 of them.

Conclusions: In our population, we found greater prevalence of ASA in the youngest pts and higher prevalence of risk factors and prothrombotic markers in the higher age groups. It appears that there isn't an association between prothrombotic factors and stroke in young adults with ASA. Other factors (morphological, functional, genetic) currently in study may contribute to understanding the underlying mechanisms.

Alunos: Pereira, PMA

Tutores: Graça L, Fonseca JE.

Laboratório, Centro ou Unidade: UNICEL/UIR

Telefone: 919360096 **Fax:** **E-mail:** pedro.pereira@campus.ul

Título: *O papel das células iNKT na patogénese do síndrome antifosfolípido.*

Palavras-Chave: *Síndrome Antifosfolípido; Células iNKT; Citocinas.*

Estudos recentes sugerem que uma subpopulação de linfócitos com o TCR $V\alpha 24$ -J $\alpha 18$ /V $\beta 11$, chamados invariante Natural Killer T cells (células iNKT), tem um papel preponderante na regulação de algumas doenças autoimunes como a artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistémico (LES) e esclerose múltipla. A síndrome de anticorpos antifosfolípidos (SAF) é uma patologia auto-imune caracterizada por um quadro pró-trombótico associado à presença de anticorpos anti complexos lipido-proteicos. Foi demonstrada recentemente a capacidade das células iNKT induzirem respostas de células B com produção de anticorpos antilipídicos. Uma vez que o papel das células iNKT na patogénese do SAF ainda não está bem estabelecido, desenvolvemos este estudo com o objectivo de identificar possíveis alterações funcionais destas células em doentes com SAF. Foi colhido sangue para citometria de fluxo de 2 doentes com SAF primário, de 4 doentes com SAF secundário a LES, de 7 doentes com LES e de 6 controlos saudáveis. Foram usadas marcações anti-V $\beta 11$ e Tetrameros α -GalCer/CD1d para identificar as células iNKT. A produção de IL4, IL10 e IFN γ foi medida após estimulação com PMA/ionomycin. Não encontramos alterações significativas do padrão funcional das células iNKT entre os doentes com SAF e LES estudados. Estudos futuros deverão ser feitos de forma a consolidar as presentes conclusões.

Students: Pereira, PMA**Tutors:** Graça L, Fonseca JE.**Laboratory, Centre, Unit:** UNICEL/UIR**Phone:** 919360096**Fax:****E-mail:** pedro.pereira@campus.ul**Title:** *Testing the iNKT cell role on Human APS pathogenesis***Key-words:** *Antiphospholipid Syndrome; iNKT cells; Cytokine*

Recent studies suggest that a sub-population of lymphocytes with the TCR V α 24-J α 18/V β 11, called invariant Natural Killer T cells (iNKT), can have a protective role against Th1-mediated autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis. The antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disease characterized by the presence of antibodies against phospholipid-protein complexes and a wide range of arterial and venous thromboembolic phenomena.

Recent evidences proved that iNKT cells have the ability to induce a strong B cell response with the production of antilipid antibodies. Since the role of iNKT cells in the APS pathogenesis is still unclear, we have planned in this study to investigate whether iNKT are involved and functionally altered in APS patients. Blood was collected for flow cytometry from 2 primary APS patients, 4 secondary APS patients with SLE, 7 SLE patients and 6 healthy controls. iNKT cells were identified according to V β 11 and α -GalCer/CD1d staining. IL4, IL10 and IFN γ cytokine production was measured after PMA/ionomycin stimulation. Our study reveals that iNKT cell functional profile is conserved among APS and SLE patients. A larger sample will have to be studied in order to confirm our observations.

Alunos: Silva FGG.**Tutores:** Santos BS.**Laboratório, Centro ou Unidade:** Unidade de Imunologia Molecular do I.M.M.**Telefone:** 914538335**Fax:****E-mail:** bsilvasantos@gmail.com**Título:** *Mecanismos de resistência dos linfomas à imunoterapia mediada por linfócitos T $\gamma\delta$.***Palavras-Chave:** *Linfócito, Imunoterapia, Linfoma.*

Fundamento: A imunoterapia tem vindo a ser considerada, desde já há algum tempo, um tratamento promissor para o cancro, mas os resultados clínicos obtidos revelam a necessidade de optimização e desenvolvimentos de novos protocolos. Os células T $\gamma\delta$ são potentes linfócitos T citotóxicos que possuem a capacidade de matar uma variedade de células tumorais humanas, em particular de linfomas e leucemias.

A alta frequência de células V γ 9V δ 2 no organismo, a sua reactividade face a pequenos compostos não-peptídicos passíveis de síntese *in vitro*, a sua diversidade de funções efectoras, e o seu largo espectro de reactividade contra as células tumorais torna-as alvos promissores para a imunoterapia do cancro. No entanto, os mecanismos moleculares mediadores do reconhecimento de células tumorais e consequente eliminação pelas células T $\gamma\delta$ permanecem largamente desconhecidos. Acreditamos que esse conhecimento será crucial para o desenvolvimento de protocolos de imunoterapia para o cancro mais eficazes, envolvendo linfócitos T $\gamma\delta$.

No nosso laboratório descobrimos que apesar de muitas linhas de células de linfoma serem sensíveis à citotoxicidade das células T $\gamma\delta$, várias outras são notavelmente resistentes. Ao comparar os padrões de transcrição de células de linfomas sensíveis e resistentes através de microarrays de cDNA, identificamos uma lista de genes candidatos que são expressos de forma diferente e agora exigem validação funcional.

Objectivos: O objectivo deste projecto é a validação dos padrões de expressão de genes candidatos e o teste das suas relevâncias funcionais na eliminação de tumores mediada por linfócitos T $\gamma\delta$ *in vitro*.

Métodos: Cultura celular; *microarrays* de RNA; *real time* PCR; Citometria de fluxo (FACS); ensaios de morte *in vitro*.

Resultados: Várias linhas de células de linfoma ou leucemia foram analisadas no que diz respeito à expressão de diferentes genes potencialmente envolvidos na resposta imune levada a cabo por células T $\gamma\delta$. Vários genes candidatos foram identificados. Entre estes genes candidatos o gene ULBP1 foi seleccionado para um estudo mais aprofundado. Células tumorais da linha RAJI (resistente à citotoxicidade das células T $\gamma\delta$) foram transfectadas com o gene candidato. Verificou-se a expressão aumentada do gene candidato nas células transfectadas, quer ao nível do mRNA, quer da proteína.

De seguida, células T $\gamma\delta$ obtidas de voluntários saudáveis foram co-cultivadas com células tumorais transfectadas ou não transfectadas, e respectivos controlos. Nessas culturas foi observado um aumento estatisticamente significativo da morte induzida nas células Raji transfectadas com gene ULBP1, quando comparadas com os respectivos controlos.

Conclusões: A expressão aumentada do gene ULBP1 em linhas de células tumorais normalmente resistentes à citotoxicidade dos linfócitos T $\gamma\delta$ aumenta significativamente a sua susceptibilidade. Assim, a imunoterapia baseada na acção dos linfócitos T $\gamma\delta$ poderá constituir uma forma de combater linfomas e leucemias que apresentem expressão aumentada do gene ULBP1. Por outro lado, devem ser investigados protocolos capazes de induzir a expressão de ULBP1 em tumores em que o gene está “silenciado”, de modo a torná-los mais “visíveis” para os linfócitos T $\gamma\delta$.

Students: Silva FGG.

Tutors: Santos BS.

Laboratory, Centre, Unit: Unidade de Imunologia Molecular do I.M.M.

Phone: 914538335 **Fax:** **E-mail:** bsilvasantos@gmail.com

Title: *Mechanisms of lymphoma resistance to $\gamma\delta$ T cell-mediated immunotherapy.*

Key-words: *Lymphocyte, Immunotherapy, Lymphoma.*

Background: Immunotherapy has long been regarded as a promising treatment for cancer, but the clinical results obtained thus far reveal much room for improvement. $\gamma\delta$ T cells are potent cytotoxic T lymphocytes that can kill a wide variety of human tumor cells, particular among lymphomas. The high frequency of V γ 9V δ 2 T cells, their reactivity towards small non-peptidic compounds amenable to in vitro synthesis, their diversity of effector functions, and their broad reactivity against tumor cells, makes them promising targets for cancer immunotherapy. However, the molecular mechanisms mediating tumor cell recognition and consequent elimination by $\gamma\delta$ T cells remains largely unknown. We believe this knowledge will be critical for the development of more efficient cancer immunotherapy protocols involving $\gamma\delta$ T lymphocytes.

In our lab we have found that although many lymphoma cell lines are susceptible to $\gamma\delta$ T cell mediated cytotoxicity, several others are strikingly resistant. By comparing the transcriptomes of susceptible and resistant lymphomas by cDNA microarrays, we have identified a list of candidate genes that are differentially expressed and now require functional validation.

Objectives: The aim of this project is to validate the expression patterns of candidate genes and to test their functional relevance in $\gamma\delta$ T cell-mediated tumor elimination *in vitro*.

Methods: Cell cultures; RNA microarray ; real time PCR; Flow Cytometry; *in vitro* killing assays.

Results: Several lymphoma and leukemia tumor cell lines were analysed for the expression of different genes potentially involved in the immune response carried out by $\gamma\delta$ T cells. Several candidate genes were identified. Among these candidate genes ULBP1 was selected for further study.

The tumor cell line RAJI (resistant to $\gamma\delta$ T cells cytotoxicity) was transfected with this candidate gene that was found to be overexpressed in transfected cells.

$\gamma\delta$ T cells obtained from healthy humans were co-cultured with transfected tumor cells and the respective non-transfected or sham-transfected controls. In these cultures, statistically significant increase in the percentage of cells undergoing apoptosis was observed in RAJI cell targets upon transfection with the ULBP1 gene.

Conclusions: Increased expression of the ULBP1 gene in tumor cell lines resistant to $\gamma\delta$ T cells cytotoxicity increases their susceptibility. Thus, immunotherapy based on $\gamma\delta$ T lymphocytes may be a way to combat lymphoma and leukemia cells showing increased expression of the ULBP1 gene.

Alunos: Gomes AR.

Tutores: Mair G, Carret C.

Laboratório, Centro ou Unidade: UPAMOL (IMM)

Telefone: 217999513 **Fax:** **E-mail:** arbgomes@hotmail.com

Título: *Determinação do papel de factores de transcrição sujeitos a repressão ao nível da tradução em Plasmodium berghei – as funções dos factores AP2 durante o desenvolvimento sexual do parasita nos estádios iniciais da fase do mosquito.*

Palavras-Chave: *Plasmodium; Factores de Transcrição ApiAP2; Repressão da Tradução*

Fundamento: A malária é uma doença transmitida por um vector que ameaça metade da população mundial e ceifou a vida de um milhão de pessoas em 2008. Deste modo, um conhecimento mais profundo da biologia molecular do parasita, nomeadamente ao nível do seu desenvolvimento sexual poderá resultar em novas estratégias de intervenção que, consequentemente, poderão levar à interrupção do seu ciclo de vida.

Actualmente, o controlo transcricional dos parasitas da malária está fracamente descrito. Deste modo, pensa-se que uma família de proteínas, ApiAP2, recentemente identificada e semelhante à família AP2/ERF, poderá constituir o principal grupo de reguladores da transcrição destes parasitas.

Objectivos: O principal objectivo deste projecto prende-se com a compreensão da função molecular de factores de transcrição ApiAP2, específicos dos estádios sexuais do parasita. Através da utilização de técnicas moleculares, genéticas, de microscopia e bioinformáticas procurámos avaliar o efeito, no ciclo de vida do parasita, de alterações ao nível do momento de expressão de 5 moléculas ApiAP2.

Métodos: Para determinar a localização subcelular hipotética das moléculas ApiAP2 foram utilizadas técnicas bioinformáticas que, aliadas a técnicas de RT-PCR nos permitiram também confirmar e corrigir os modelos dos genes. Procedeu-se à clonagem de cDNAs em vectores de expressão de GST, para a expressão heteróloga de proteínas, e à construção de vectores marcados com GFP para a transfecção de estirpes selvagem de *Plasmodium berghei*. Os parasitas transfectados foram genotipados por PCR e microscopia de fluorescência. Técnicas de imunofluorescência (IFA) e hibridização (FISH) permitiram-nos ainda avaliar a co-localização entre os transcritos apiap2 e a proteína DOZI, envolvida no fenómeno de regulação por silenciamento.

Resultados: Os modelos dos genes em estudo foram confirmados e num dos casos corrigido por técnicas bioinformáticas e de RT-PCR. Porções das respectivas sequências de cDNA foram clonadas em vectores de expressão heteróloga para a produção de proteínas de fusão com GST, em *E.coli*. Técnicas bioinformáticas sugeriram ainda uma localização nuclear para estas proteínas. A análise por imunofluorescência, em combinação com a técnica de FISH, em gametócitos femininos, indicou a localização dos transcritos apiap2 em corpos subcelulares designados por P-bodies, responsáveis pela repressão das moléculas em estudo. Os vectores de expressão marcados com GFP foram transfectados para estirpes selvagem de *P. berghei* e a genotipagem de populações de parasitas transgénicos revelou a presença de 3 linhas mutantes.

Conclusões: Demonstrámos que os transcritos apiap2 se localizam em corpos de silenciamento presentes nos gametócitos. Actualmente, a expressão e purificação de moléculas ApiAP2 recombinantes encontra-se em curso e a caracterização fenotípica de 3 linhas de parasitas transgénicos está agendada e permitir-nos-á avaliar o impacto que as alterações induzidas na expressão destas proteínas poderá ter na sobrevivência do parasita durante o seu ciclo de vida.

Students: Gomes AR.

Tutors: Mair G, Carret C.

Laboratory, Centre, Unit: UPAMOL (IMM)

Phone: 217999513

Fax:

E-mail: arbgomes@hotmail.com

Title: *Tracking the role of translationally silenced transcription factors in Plasmodium berghei – the functions of AP2 factors during early sexual developmental mosquito stages.*

Key-words: *Plasmodium, ApiAP2 Transcription Factors, Translational Repression*

Background: Malaria is a vector borne disease that endangers half of the world's population and caused the death of 1 million people in 2008. A better understanding of the basic biology of *Plasmodium* parasites is imperative and may lead to novel intervention strategies that interfere with the parasite's life cycle. Transcriptional control of *Plasmodium* parasites is poorly understood; with a lack of many of the classic transcription factors (TFs) a recently identified group of AP2/ERF-like proteins may constitute the main transcriptional regulators of these protozoa.

Objectives: The main objective is to understand the molecular function of sexual stage specific ApiAP2 TFs. Using a combination of bioinformatics, imaging, molecular and genetic tools, we aimed at appreciating the effect that an early/mis-timed expression of 5 translationally silenced ApiAP2 will have on the life cycle of the parasite.

Methods: Bio-informatic analysis was used to predict subcellular AP2 localization and in combination with RT-PCR to confirm and correct predicted gene models. cDNAs were cloned into GST expression vectors for heterologous protein expression, and GFP-tagged plasmids generated for *P. berghei* transfection. Transfected parasites were genotyped using PCR and fluorescence microscopy. Wild type gametocytes (female sexual precursor cells) were used for immunofluorescence analysis (IFA) in combination with FISH to determine if *apiap2* transcripts co-localize with DOZI, a key protein involved in translational silencing.

Results: Through bio-informatic and RT-CPR analysis predicted gene models were confirmed and in one instance corrected; partial cDNAs were cloned into heterologous expression vectors for GST-recombinant protein expression in *E. coli*. Bio-informatic tools show the presence of nuclear localization signals. Immunofluorescence analysis for DOZI in combination with FISH indicate localization of *apiap2* transcripts in translationally quiescent P bodies of female gametocytes. GFP tagging vectors were transfected into wild type *P. berghei* and transgenic parasite populations genotyped by PCR, revealing the generation of 3 mutant parasite lines.

Conclusions: We have shown that *apiap2* localize in silenced bodies in female gametocytes. Recombinant expression and purification of ApiAP2 is ongoing. Phenotypic characterization of transgenic parasite lines is already scheduled and will verify the impact that the early/mis-timed expression of 3 ApiAP2 TFs normally repressed will have on the parasite survival through its life cycle.

Alunos: Couto CB.

Tutores: Rodrigues dos Santos C, Mendes Almeida JC.

Laboratório, Centro ou Unidade: CIPM, Serviço Cirurgia Geral IPOLFG

Telefone: 965308236

Fax:

E-mail: catarinarsantos@hotmail.com

Título: *Células Endoteliais Circulantes como Marcadores de Resposta à Terapêutica no Cancro da Mama Localmente Avançado*

Palavras-Chave: *Cancro da Mama, Angiogénese, Células Endoteliais Circulantes.*

O cancro da mama é a neoplasia mais frequente em mulheres. Diversos marcadores têm sido estudados no sentido de otimizar a decisão terapêutica e determinar o prognóstico.

Resultado da evidência do papel da angiogénese no crescimento tumoral e do potencial de tratamento com drogas antiangiogénicas, vários métodos de quantificação da angiogénese têm sido propostos. Vários estudos pré clínicos e clínicos revelaram o aumento de células endoteliais maduras (diferenciadas) de células endoteliais progenitoras (indiferenciadas), no sangue periférico, indiciando o seu recrutamento para o crescimento tumoral

Neste estudo pretende-se avaliar a cinética das células endoteliais circulantes no sangue periférico, identificadas por citometria de fluxo, em doentes com cancro da mama localmente avançado, submetidas a quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia, como marcador da resposta à terapêutica.

Students: Couto CB.

Tutors: Rodrigues dos Santos C, Mendes Almeida JC..

Laboratory, Centre, Unit: CIPM, Serviço Cirurgia Geral IPOLFG

Phone: 965308236 **Fax:** **E-mail:** catarinarsantos@hotmail.com

Title: *Circulating Endothelial Cells as markers of Therapeutic Response in Locally Advanced Breast cancer.*

Key-words: *Breast cancer, Angiogenesis, Circulating Endothelial Cells*

Breast cancer is the most frequent cancer in women. Several markers have been studied in order to optimize the therapeutic and predict prognosis.

The role of angiogenesis in the growth of tumours and the potential therapeutics of antiangiogenic drugs derives interest in quantification of this process as a biomarker.

Pre clinical and clinical data show an increase of circulating endothelial cells (differentiated) and progenitor endothelial cells (undifferentiated), in circulation, suggesting their recruitment to tumour growing.

The aim of this study is to determine the kinetics of CEC, in peripheric blood of patients with locally advanced breast cancer who were submitted to neoadjuvant chemotherapy and surgery, as a marker of treatment response

Alunos: Medeiros FC.

Tutores: Melo Cristino J.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Microbiologia

Telefone: 217999458 **Fax:** **E-mail:** fmedeiros@campus.ul.pt

Título: *Caracterização epidemiológica e molecular de estirpes do Complexo Bovis isolados a partir do Homem em Portugal.*

Palavras-Chave: *Complexo Bovis, Susceptibilidade aos Antimicrobianos, Estrutura Clonal*

Fundamento: O complexo Bovis engloba um conjunto de novas espécies, anteriormente identificadas como *Streptococcus bovis*, responsáveis por várias patologias infecciosas. Devido à reorganização taxonómica das espécies incluídas no Complexo Bovis, torna-se necessário conhecer as respectivas estirpes, as infecções causadas e a possível relação com a estrutura clonal.

Objectivos: Conhecer a prevalência das estirpes do Complexo Bovis, e avaliar a relação entre as infecções e os vários biótipos. Conhecer a susceptibilidade aos antimicrobianos e identificar os respectivos genes de resistência. Caracterizar a relação molecular entre as espécies isoladas, a sua estrutura clonal e possível relação com infecções específicas.

Métodos: A identificação da espécie foi efectuada recorrendo ao API20 Strep System, conjuntamente com a sequenciação do gene *sodA*. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada por método de difusão com discos segundo as normas do CLSI. Os antimicrobianos utilizados foram penicilina, cefotaxima, eritromicina, clindamicina, cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, estreptomomicina, linezolid, vancomicina e levofloxacina. Identificaram-se os genes de resistência aos macrólidos e tetraciclina por PCR. A tipagem molecular foi efectuada através de electroforese em campo pulsado (PFGE), após digestão do DNA total com SmaI

Resultados: A identificação pelo sistema API identificou as estirpes como *S. gallolyticus* subsp *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp *pasteurianus*, *S. infantarius* subsp *infantarius*, *S. infantarius* subsp *coli* e *S. bovis* 114. A sequenciação do gene *sodA* identificou as estirpes como *S. gallolyticus* (38), *S. pasteurianus* (33), *S. lutetiensis* (16) e *S. infantarius* (5). Entre estes sistemas, há correspondência total entre *S. gallolyticus* subsp *gallolyticus* e *S. gallolyticus* subsp *pasteurianus* com *S. gallolyticus* e *S. pasteurianus* respectivamente. Cerca de 65% das estirpes isoladas a partir de sangue pertencem à espécie *S. gallolyticus*. Do total das estirpes resistente aos macrólidos, 57% destas pertencem à espécie *S. pasteurianus*, sendo os genes *ermB* e *ermT* os principais genes de resistência. Verificou-se heterogeneidade de estrutura clonal.

Conclusões: A identificação pelo método de sequenciação do gene *sodA* foi o preferido, pela menor ambiguidade comparativamente com as provas bioquímicas. Verificou-se distribuição heterogénea das espécies de Complexo Bovis pelas várias infecções causadas, sendo *S. gallolyticus* a principal isolada do sangue. As estirpes de *S. pasteurianus* são as que apresentam maior número de resistências aos macrólidos, sendo as únicas com fenótipo iMLS_B. Quanto à estrutura clonal, verifica-se uma grande diversidade de clones, não havendo especificidade com a infecção causada.

Students: Medeiros FC.

Tutors: Melo Cristino J.

Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Microbiologia

Phone: 217999458

Fax:

E-mail: fmedeiros@fm.ul.pt

Title: *Epidemiological and Molecular characterization of Bovis Group strains of Clinical Isolates in Portugal.*

Key-words: *Bovis group, Antimicrobial susceptibility, Genetic cluster.*

Background: The Bovis Group includes a set of new species, previously identified as *Streptococcus bovis*, and causative agents of several infectious pathologies. Due to taxonomic reorganization of the enclosed species in the Bovis Group, becomes necessary to know the respective strains, the caused infections and the possible relationship with the clonal structure.

Objectives: Know the prevalence of strains of the Bovis Group and their relationship with the infections caused. Test antimicrobial susceptibility and identify resistance genes. Characterize the molecular relationship between the isolated strains, establish their clonal structure and verify any relationship between genetic clusters and the caused infection.

Methods: Species were identified using API20 Strep System together with *sodA* gene sequencing. Antibiotic susceptibilities were determined with the Kirby-Bauer disk-diffusion method, according to CLSI guidelines for penicillin, cefotaxime, clindamicin, cloramphenicol, tetracycline, gentamicin, streptomycin, linezolid, vancomycin and levofloxacin. We searched for the presence of erythromycin and tetracyclin resistance genes by PCR. Genotyping was made using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) after digestion with *Sma*I. PFGE profiles were subjected to cluster analysis using Bionumerics software.

Results: API20 System identified two species and four subspecies. *sodA* gene sequencing identified strains as *S. gallolyticus* (38), *S. pasteurianus* (33), *S. lutetiensis* (16) and *S. infantarius* (5). Between these two identification systems, there is total correspondence between *S. gallolyticus* spp *gallolyticus* and *S. gallolyticus* spp *pasteurianus* with *S. gallolyticus* and *S. pasteurianus*, respectively. About 65% of the isolated strains from blood were identified as *S. gallolyticus*. Of all resistant strains to macrolides, 57% of these belong to *S. pasteurianus*, with *ermB* and *ermT* the main responsible resistance genes. It was verified a great heterogeneous clonal structure.

Conclusions: *sodA* gene sequencing was the preferred method of identification, being less ambiguous than biochemical tests. There was heterogeneous distribution of strains by the various infections, with *S. gallolyticus* the major blood pathogen. *S. pasteurianus* was the species with more macrolide resistance, and the only with the iMLSB phenotype. There is a great diversity of genetic clusters, and no specific association with type of infection.

Alunos: Domke A.

Tutores: Ramirez M.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Microbiologia

Telefone: 217999458

Fax: 217999459

E-mail: andreas.domke1984@gmail.com

Título: *Epidemiologia de infecções por SGB invasivas em adultos não grávidos em Portugal.*

Palavras-Chave: *Epidemiologia, SGB, Portugal.*

Fundamento: Os *Streptococci* grupo-B de Lancefield (SGB) ou *Streptococcus agalactiae* são bactérias gram positivas β-hemolíticas principalmente conhecidas por serem causadoras de sépsis neonatal com elevada mortalidade. Contudo, enquanto a incidência de infecções neonatais por SGB tem decrescido devido a medidas preventivas, o número de infecções invasivas em idosos, principalmente associadas a situações de comprometimento imune como neoplasias e *diabetes mellitus*, está a aumentar. As manifestações clínicas variam desde infecções comuns da pele e dos tecidos moles ou do tracto urinário até pneumonia e sépsis. As SGB são uniformemente consideradas como 100% susceptíveis à penicilina, existindo um número crescente de estirpes com resistência aos macrólidos e à clindamicina, que são frequentemente usadas em caso de alergia à penicilina. Uma vacina contra os serotipos mais comuns na Europa (Ia, Ib, II, III e V) encontra-se em ensaios clínicos.

Objectivos: Primeira caracterização epidemiológica de infecções por SGB invasivas em Portugal em adultos não-grávidos visando a frequência dos serotipos e das proteínas de superfície, a susceptibilidade antimicrobiana e uma caracterização genética.

Métodos: Este estudo epidemiológico foi realizado em 226 SGB todas responsáveis por infecções invasivas em adultos colhidas entre 2001 e 2008. A principal fonte de estirpes foi o sangue e algumas foram obtidas de outros fluidos normalmente estéreis, como o líquido cefaloraquidiano (LCR). Num primeiro passo, a serotipagem capsular foi realizada utilizando soros para os tipos Ia, Ib, II-VIII. A susceptibilidade antimicrobiana testada para clindamicina, eritromicina, tetraciclina, clorafenicol e levofloxacina foi executada por fusão de discos de acordo com as actuais Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines. A identificação das proteínas de superfície foi realizada através da técnica Polymerase Chain Reaction (PCR) e a caracterização genética através de Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).

Resultados: A distribuição dos serotipos das estirpes foi: Ia (35,4%), V (18,1%), III (14,6%), II (10,6%) e Ib (9,7%), IV foi identificada duas vezes e VI e VII uma vez. 9,7% das amostras foram não-tipáveis. As proteínas de superfície foram distribuídas da seguinte forma: BCA (31%), EPS (30,5%), RIB (24,2%), ALP3 (11,2%) e ALP (3,1%). A PFGE identificou vários agrupamentos genéticos, cada um com mais de 80% de correlação genética. Em geral, cada grupo apresenta uma dominância de alguns serotipos e proteínas de superfície. Desta forma é possível dizer que, cada grupo é caracterizado por um determinado serotipo, como no caso do maior grupo, que consiste em 74 estirpes com um serotipo predominantemente Ia (93%), mas contrariamente nenhum serotipo nem nenhuma proteína de superfície é caracterizada por um determinado grupo, porque estes surgem também em outros grupos. Os testes para a susceptibilidade antimicrobiana mostraram que, 10,6% das estirpes eram resistentes à eritromicina, 6,6% à clindamicina e 1,3% à levofloxacina. Como esperado, um número muito elevado de estirpes foi resistente às tetraciclina (79%).

Discussão: A distribuição dos serotipos coincide em parte com estudos de outros países e o uso de uma vacina para grupos em risco deve ser considerado. Deve existir cuidado no tratamento de doentes com eritromicina ou clindamicina devido às resistências.

Students: Domke A.

Tutors: Ramirez M.

Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Microbiologia

Phone: 217999458 **Fax:** 217999459 **E-mail:** andreas.domke1984@gmail.com

Title: *Epidemiology of invasive GBS infections in non pregnant adults in Portugal.*

Key-words: *Epidemiology, GBS, Portugal.*

Background: Lancefield group-B streptococci (GBS) or *Streptococcus agalactiae* are β -haemolytic gram-positive bacteria that are mainly known for causing neonatal sepsis with a high mortality. But while the incidence of neonatal GBS infections decreases due to preventive measures, the number of invasive infections in elderly adults, mainly associated with immuno compromising situations like malignancies and diabetes mellitus, is emerging. The clinical manifestations are range from frequent softtissue and skin infections and urinary tract infections to pneumonia and sepsis. While GBS are considered uniformly 100% susceptible to penicillin, there are a rising number of strains with resistance against macrolides and clindamycin, which are often used in case of allergy to penicillin. A vaccine against the most common serotypes (Ia, Ib, II, III and V) in Europe is in clinical trials.

Objectives: First epidemiologic characterization of invasive GBS infections in Portugal of non-pregnant adults regarding the frequencies of the serotypes and the surface proteins, the antimicrobial susceptibility and a genetic characterization.

Methods: We performed this epidemiologic study on 226 GBS all responsible for invasive infections in adults collected between 2001 and 2008. The main source of the strains was blood and some were taken from other normally sterile fluids including cerebrospinal fluid (CSF). In a first step capsular serotyping was performed by slide agglutination using sera for types Ia, Ib, II-VIII. Antimicrobial susceptibility testing to clindamycin, erythromycin, tetracycline, chloramphenicol and levofloxacin was executed by disk diffusion according to the current Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to identify the surface proteins and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) for the genetically characterization.

Results: The distribution of the serotypes of the strains was Ia (35,4%), V (18,1%) and III (14,6%), II (10,6%), Ib (9,7%), IV was identified twice and VI and VII were once. 9,7% of the samples were nontypeable. The surface proteins were distributed as following: BCA (31%), EPS (30,5%), RIB (24,2%), ALP3 (11,2%) and ALP (3,1%). PFGE identified several genetic clusters, each with more than 80% genetic correlation. In general each group shows a dominance of some serotypes and surface proteins. In this way it is possible to say, that one group is characterized by a certain serotype, like in the case of the biggest group, which consists of 74 strains with a serotype predominantly Ia (93%), but on the other hand neither a serotype nor a surface protein is characterized by a certain group, because it appears also in other groups. Testing for antimicrobial susceptibility showed, that 10,6% of the strains were resistant to erythromycin, 6,6% to clindamycin, 1,3% were resistant to levofloxacin. As expected a very high number (79%) of the strains were resistant to tetracycline.

Discussion: The distribution of the serotypes corresponds in parts with studies from other countries and the use of a vaccine for groups at risk should be considered. There should be awareness in treating patients with erythromycin or clindamycin because of the resistances.

Alunos: Neto Fernandes RS.

Tutores: Nicola P, Fernandes M.

Laboratório, Centro ou Unidade: Unidade Epidemiologia – IMP

Telefone: 217999422 ext. 47090 **Fax:** 21 799 94 21 **E-mail:** mepidemiologia@fm.ul.pt

Título: *Factores de Adesão à Terapêutica Antibiótica Numa População do Concelho de Lisboa.*

Palavras-Chave: *Antibióticos, Adesão à terapêutica.*

Fundamento: O desenvolvimento de resistências a antibióticos (AB) e consequente diminuição da sua actividade terapêutica é um problema de saúde pública crescente, relacionado com a incorrecta utilização destes medicamentos. Adicionalmente, uma fraca adesão à terapêutica antibacteriana pode resultar no insucesso do tratamento e no aumento da taxa de reincidência de infecções. Em Portugal, de acordo com um estudo de 2000, a não-adesão global à terapêutica antibacteriana foi estimada em 40,7%.

Objectivos: Avaliar a dimensão da não adesão à terapêutica antibacteriana em situações de doença infecciosa aguda numa população de utentes de farmácias do concelho de Lisboa.

Métodos: Estudo observacional prospectivo analítico, com amostragem probabilística multietápica por clusters. De Fevereiro a Abril de 2009, foram convidados a participar no estudo os utentes de uma amostra aleatória de farmácias do concelho de Lisboa, com idade \geq 18 anos e prescrição médica de um AB de forma farmacêutica oral sólida. Aos utentes elegíveis, foi aplicado um questionário na farmácia para recolha de informação do utente e do AB prescrito. Após a data final prevista do tratamento, os utentes foram contactados por telefone e convidados a responder a um novo questionário para recolha de informação sobre a adesão à terapêutica. Todos os indivíduos que responderam afirmativamente a pelo menos uma pergunta da versão portuguesa da escala de Morisky foram classificados como não-aderentes.

Resultados: Em 40 farmácias participantes (de 100 convidadas aleatoriamente a participar), foram recrutados 315 doentes elegíveis para entrevista telefónica, concluída em 253 (80%) dos indivíduos. A média de idades dos participantes foi $46,1 \pm 17,1$ anos, com 188 (74,3%) mulheres. A maioria ($n=92$, 36,3%) teve o AB prescrito por um médico de Medicina Geral e Familiar. 103 (40,7%) dos AB prescritos pertencem ao grupo das associações de penicilina com inibidores das β -lactamases. Quando questionados sobre diferentes dimensões da adesão, 34 (13,6%) responderam sim à pergunta “Alguma vez se esqueceu de tomar o AB?”, 6 (2,4%) à pergunta “Alguma vez deixou de tomar o AB por se ter sentido melhor?”, 6 (2,4%) à pergunta “(...) por se ter sentido pior” e 96 (38,4%) à pergunta “Alguma vez tomou o AB fora de horas?”. Para esta última questão, a mediana do intervalo em relação à hora de toma prevista foi 60 minutos (P25 30; P75 97,5). Assumindo como não-aderentes quanto à hora de toma os indivíduos com uma diferença superior a 2h para frequência de toma 1/dia e 1h para os restantes, apenas 27 (10,8%) foram considerados não-aderentes quanto à hora de toma. Assim, os resultados obtidos com base na escala de Morisky indicam uma prevalência de não-adesão de 23,2% ($n=58$; IC95% 18%; 29%)

Conclusões: Nos indivíduos em estudo, os principais motivos da não-adesão à terapêutica AB estão relacionados com o tomar fora de horas ou esquecer de tomar. A prevalência da não-adesão está enquadrada dentro dos resultados encontrados para outros países, em estudos com aplicação de questionário aos doentes, sendo necessário comparar o valor encontrado com outras metodologias de avaliação e relacionar com eventuais factores associados.

Students: Neto Fernandes RS.

Tutors: Nicola P, Fernandes M.

Laboratory, Centre, Unit: Unidade Epidemiologia – IMP

Phone: 217999422 ext. 47090 **Fax:** 21 799 94 21 **E-mail:** mepidemiologia@fm.ul.pt

Title: *Adherence to Antibiotics: following a patient's population from Lisbon.*

Key-words: *Antibiotics, Adherence, Patient compliance.*

Background: The increase of antibiotic resistance and associated decrease of effective therapeutic options are an emerging public health problem, associated to non-adherence to antibiotics (AB), which may also lead to therapeutic failure and re-infection. In Portugal, global nonadherence to antibiotics was estimated to be of 40.7% in a 2000 study.

Objectives: To quantify nonadherence to antibiotics used in acute infectious diseases at ambulatory level, in a patient's population attending community pharmacies in Lisbon.

Methods: Observational prospective study, with a two-stage cluster sample. The patients attending to a random sample of community pharmacies from Lisbon's region, aged ≥ 18 years, with a prescription of an oral AB, were systematically invited to participate in the study. For each eligible participant, a formulary was fulfilled by the pharmacist, collecting data from the prescription and related to the participant. After the predicted date for the treatment conclusion, participants were contacted to answer a phone interview regarding adherence evaluation and related factors. All the participants who answered positively to, at least, one question from the Portuguese version of Morisky self-report scale, were classified as nonadherents.

Results: In 40 community pharmacies (from 100 invited to the study), 315 eligible patients were invited to participate in the study. The phone interview was concluded for 253 (80%) participants, with an average age of 46.1 ± 17.1 years, and 188 (74.3%) women. Most of the participants ($n=92$, 36.3%) had their AB prescription from a general physician, and 103 (40.7%) of the prescribed AB were combinations of penicillins, including beta-lactamase inhibitors. When questioned about different adherence' dimensions, 34 (13.6%) answered positively to the question "Did you forget to take your AB?", 6 (2.4%) to "Did you sometimes stop taking your AB because you felt better?", 6 (2.4%) to "(...) felt worse?", and 96 (38.4%) to "Have you ever take your AB out of schedule?". Regarding this last question, median time interval from predicted hour of dose taking was 60 minutes (P25 30; P75 97.5). Participants were classified as nonadherents if they had a difference of 2 hours for one daily dose regimen and 1 hour for other regimens. With this criteria, only 27 (10.8%) were classified as nonadherents regarding timing adherence. Based on Morisky' scale, nonadherence prevalence is 23.2% ($n=58$; CI95% 18%, 29%) for this sample.

Conclusions: In this study, the main reasons for nonadherence seem to be related to timing and forgetting to take the AB. While nonadherence prevalence is similar to the results in other studies that applied a questionnaire to the patients for adherence evaluation, it is still necessary to compare these results with other methodologies and to explore possible relationships with other variables.

Alunos: Marques CA.

Tutores: Prudêncio, M.

Laboratório, Centro ou Unidade: Unidade de Malária (IMM)

Telefone: 217 999 511 **Fax:** 217 999 504 **E-mail:** catarina.a.mar@gmail.com

Título: *Derivados Imidazolidin-4-one da Primaquina: o seu impacto na fase hepática da Malária*

Palavras-Chave: *Malária, Fase hepática da infecção, Primaquina.*

Fundamento: Anualmente, a malária é responsável por cerca de 250 milhões de novos casos clínicos e 1 milhão de mortes, permanecendo a doença infecciosa transmitida por um vector mais mortífera do mundo. O parasita da malária, *Plasmodium sp.*, é transmitido ao hospedeiro mamífero sob a forma de esporozoítos, através da picada de um mosquito fêmea infectado do género *Anopheles*. Os parasitas infectam inicialmente as células hepáticas do hospedeiro, fase obrigatória e assintomática da infecção ao qual o parasita se desenvolve antes de ser capaz de infectar os eritrócitos e dar assim, início à fase sintomática da doença. Sendo crucial para o desenvolvimento da doença, a fase hepática da infecção constitui um ponto importante onde podem ser implementadas medidas antimaláricas, incluindo de bloqueio da transmissão ao mosquito. Actualmente a primaquina, uma 8-aminoquinolona, é o único medicamento antimalárico disponível na clínica capaz de eliminar as formas de esquizonte do parasita no fígado, apresentando um espectro de acção alargado contra diferentes estádios de desenvolvimento do parasita (no fígado ou no sangue) e espécies de *Plasmodium*. Apesar da sua significativa aplicabilidade como antimalárico, a utilização da primaquina tem sido limitada, devido à sua toxicidade sanguínea e reduzida disponibilidade oral, em consequência dos produtos tóxicos e inactivos do seu metabolismo. Com o intuito de superar estas limitações, têm-se concentrado esforços no desenvolvimento de compostos derivados da primaquina. Uma das estratégias utilizadas envolve a criação de uma dupla pró-droga, com o desenvolvimento de derivados peptídicos e aminoácidos da primaquina, associados a um motivo de imidazolidin-4-one.

Objectivos: O presente projecto teve como propósito avaliar o efeito de vários derivados imidazolidin-4-one da primaquina no desenvolvimento do parasita durante a fase hepática da infecção, e determinar os seus valores de IC50 (metade da concentração inibitória máxima de uma substância), utilizando modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Métodos: Como modelo *in vitro*, incubaram-se células Huh7 com o derivado imidazolidin-4-one da primaquina escolhido (BD4-501 a BD4-508) durante cerca de uma hora, antes de serem infectadas com esporozoítos de *Plasmodium berghei* (um parasita de ratinhos) que expressam GFP. O efeito dos derivados nos processos de invasão dos hepatócitos e desenvolvimento intrahepatocítico do parasita foi acedido através da análise das amostras por Citometria de Fluxo (FACS).

Resultados e Conclusões: Os resultados obtidos demonstram que todos os derivados imidazolidin-4-one da primaquina testados exercem algum efeito inibitório no desenvolvimento intrahepático do parasita mas que, infelizmente, nenhum possui um efeito igual ou superior que o exercido pela própria primaquina. Os valores de IC50 calculados confirmam estes resultados, sendo que o valor da primaquina obtido foi de $2,05 \mu\text{M}$, enquanto os valores obtidos para os derivados testados oscilaram entre $9,69 \mu\text{M}$ (BD4-508) e $25,77 \mu\text{M}$ (BD4-504). Uma vez que a primaquina possui um efeito superior que quaisquer dos derivados testados, não foram efectuados ensaios *ex vivo* e *in vivo*. Desta forma, futuros desenvolvimentos devem ser efectuados sob estes derivados da primaquina com o intuito de melhorar a sua actividade antimalárica contra as formas hepáticas do parasita.

Students: Marques CA.

Tutors: Prudêncio, M.

Laboratory, Centre, Unit: Unidade de Malária (IMM)

Phone: 217 999 511 **Fax:** 217 999 504 **E-mail:** catarina.a.mar@gmail.com

Title: *Imidazolidin-4-one Derivatives of Primaquine: their impact on Plasmodium liver stage infection.*

Key-words: *Plasmodium, Primaquine derivatives, Liver stage malaria.*

Background: Annually, malaria is responsible for nearly 250 million clinical cases of disease and 1 million deaths, remaining the world's most deadly vector-borne infectious disease. Sporozoites of the malaria parasite *Plasmodium sp.* are transmitted to the mammalian host by the bite of an infected female *Anopheles* mosquito. The parasites first infect the host liver cells, an obligatory and asymptomatic stage of infection where the parasite develops before infecting erythrocytes, thus starting the symptomatic stage of the disease. Because the liver stage of infection is essential for the development of the disease, it is an important point where to implement antimalarial measures, including blocking the parasite's transmission to the mosquito. Primaquine, an 8-aminoquinoline, is currently the only liver schizonticide antimalarial clinically available, displaying a broad activity against several developmental stages of the parasite, either in the liver or in the blood, and species of *Plasmodium*. However, despite its wide application as an antimalarial, primaquine's use has been limited due to its associated blood toxicity and limited oral availability, owing to toxic and inactive products of its metabolism, respectively. In order to overcome these drawbacks, the development of primaquine derivatives has been attempted. One of the developed approaches comprises a double prodrug design, which encompasses the development of peptide and amino acid derivatives of primaquine, associated with an Imidazolidin-4-one moiety.

Objectives: The aim of this project was to access the effect of several imidazolidin-4-one derivatives of primaquine against the parasite development during the liver stage of malaria infection, and to determine their IC50 values (half maximal (50%) inhibitory concentration (IC) of a substance), using both *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models.

Methods: As an *in vitro* model, Huh7 cells were incubated with the specific imidazolidin-4-one derivative of primaquine (BD4-501 to BD4-508) for about an hour before infection with GFP expressing *Plasmodium berghei* (a mice parasite) sporozoites. Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) was used to access the effect of the derivative on parasite's hepatocyte invasion and intrahepatocyte development.

Results and Conclusions: The results obtained showed that all imidazolidine-4-ones derivatives of primaquine herein tested have actually some effect on parasite intrahepatocyte development, but unfortunately, none of them has equal or stronger effect than primaquine itself. Determined IC50 values confirmed these results; primaquine's value was of 2,05µM whereas primaquine derivatives tested values ranged between 9,69 µM (BD4-508) to 25,77 µM (BD4-504). Because primaquine has a stronger effect than the derivatives tested, no *ex vivo* and *in vivo* assays were performed. Therefore, further developments must be made concerning these primaquine derivatives in order to improve their antimalarial activity against the liver stage forms of the malaria parasite.

Alunos: Oliveira A.

Tutores: Graça L.

Laboratório, Centro ou Unidade: Laboratório de Imunologia Básica - Unidade de Imunologia Celular (IMM)

Telefone: 21 799 94 67 **Fax:** 21 798 51 42 **E-mail:** aoliveira.work@gmail.com

Título: *Efeito de anti-CD4 não depletante em modelo animal com alergia nas vias respiratórias.*

Palavras-Chave: *Alergia, Anticorpos monoclonais, Tolerância.*

Fundamento: As respostas imunitárias patológicas, onde se inclui a alergia, as doenças autoimunes e a rejeição de transplantes têm vindo a aumentar a morbidade e mortalidade nos recentes anos, pelo que o seu controlo se torna fundamental. Tem vindo a ser demonstrado que é possível uma modulação da resposta imunitária utilizando anticorpos monoclonais (mAbs) não depletantes para o CD4 - que já demonstraram uma acção *in vivo* na indução de tolerância imunológica específica, em modelos animais, tendo já sido provado a manutenção de tolerância em doenças como a artrite e diabetes. Actualmente, num modelo animal de hiperreactividade das vias aéreas o antiCD4 já mostrou ter um papel protector em sensibilizações com ovalbumina (OVA), a OVA é extensamente em laboratório contudo não apresenta é relevante em doenças associadas aos humanos, nesta perspectiva torna-se premente investigar se o anti CD4 consegue igualmente controlar uma resposta a um alergénio um pouco mais complexo mas importante na doença humana como o ácaro Dermatophagoides.

Objectivos: Com este trabalho pretendemos demonstrar que o antiCD4 não depletante consegue induzir tolerância no modelo animal com hiperreactividade das vias aéreas a extracto de ácaro Dermatophagoides.

Métodos: Utilizámos um modelo animal estabelecido de alergia induzida para a extracto de ácaro, onde foi avaliada a hiperreactividade das vias aéreas (função respiratória, celularidade no lavado bronco-alveolar (BAL), visualização histológica) e a resposta TH2 associada (citocinas-IL-4, IL-5, IL-13 e imunoglobulinas- Ig1a e IgE).

Resultados: Animais que receberam anti-CD4 apresentam os menos sintomas nos parâmetros que definem a hiperreactividade das vias aéreas: menor eosinofilia no BAL e a função respiratória que se mostrou compatível a um animal saudável. O tratamento com anti-CD4 também mostrou ser capaz de impedir o aumento de IgG1, IgE e citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13) associadas a uma resposta Th2. Foi controlado se o efeito não derivava de uma alteração da resposta de Th2 para Th1, mas as imunoglobulinas e citocinas associadas a Th1 (IG2a, IFN- γ) não sofreram alterações. Por último, não se observou uma alteração dos níveis de IL-10.

Conclusões: Os nossos resultados demonstram que em animais é possível prevenir a sensibilização e induzir tolerância. Animais aos quais foi administrado o anti-CD4 na sensibilização não desenvolvem a doença mesmo após ressensibilização ao fim de 4 semanas. Os animais expostos a mAbs tolerogénicos não depletantes para CD4 são capazes de manter a função respiratória equiparada à de um animal saudável. Resta avaliar os outros parâmetros e de investigar se este tipo de tratamento consegue recuperar animais previamente sensibilizados.

Students: Oliveira A.

Tutors: Graça L.

Laboratory, Centre, Unit: Laboratório de Imunologia Básica - Unidade de Imunologia Celular (IMM)

Phone: 21 799 94 67 **Fax:** 21 798 51 42 **E-mail:** aoliveira.work@gmail.com

Title: *The effect of non-depleting anti-CD4 in an animal model of allergic airways disease.*

Key-words: *Allergy, Monoclonal antibodies, Tolerance.*

Background: Pathological immune responses, which include allergy, autoimmune diseases and transplant rejection have increased morbidity and mortality in recent years, so its control have become crucial. It has been shown to be possible modulation of immune responses using non depleting monoclonal antibodies (mAbs) to CD4 – this have shown in vivo action by inducing specific immune tolerance in animal models and has been proven to maintain tolerance in diseases such as arthritis and diabetes. Currently, an animal model of airway hyperresponsiveness treated with anti-CD4 has been shown to have a protective role in sensitizations with ovalbumin (OVA), the OVA is extensively used in the laboratory but is not relevant to human diseases, in this regard is urgent to investigate the anti-CD4 can also control a response to an allergen a little more complex but important in human disease and the mite *Dermatophagoides*.

Objectives: In this paper we demonstrate that the anti-CD4 non depleting can induce tolerance in an animal model of airway hyperresponsiveness to mite extract *Dermatophagoides*.

Methods: We used an established animal model of induced allergic to mite extract, which was evaluated hyperresponsiveness of the airways (lung function, cellularity in bronchoalveolar lavage (BAL), histological view) and associated TH2 response (cytokines, IL-4, IL-5, IL-13 and immunoglobulins-Ig1a and IgE).

Results: Animals treated with anti-CD4 have the least symptoms of the parameters that define the airway hyperresponsiveness: lower BAL eosinophilia and lung function, which proved compatible with a healthy animal. Treatment with anti-CD4 also proved to be capable preventing the increase of IgG1, IgE and cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13) associated with a Th2 response. It was checked whether the effect is not derived from a change in the Th2 response to Th1, but immunoglobulins and cytokines associated with Th1 (IG2a, IFN- γ) remain unchanged. Finally, there was no change in the levels of IL-10.

Conclusions: Our results demonstrate that in animals it is possible to prevent sensitization and induce tolerance. Animals that have been given anti-CD4 in sensitization do not develop the disease even after re-sensitization after 4 weeks. The animals exposed to non depleting tolerogenic mAbs for CD4 are able to maintain respiratory function compared to that of a healthy animal. It remains to evaluate the other parameters and to investigate whether such treatment can restore previously sensitized animals.

Alunos: Sousa D.

Tutores: Castanho M, Veiga AS.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Bioquímica

Telefone: 217985136 **Fax:** 217999477 **E-mail:** davidscsousa@gmail.com

Título: *O papel das membranas lipídicas na formação de partículas virais do vírus da Dengue.*

Palavras-Chave: *Vírus da Dengue, Proteína C, Membrana Celular.*

Fundamento: A febre hemorrágica de origem viral é uma síndrome clínica que, hoje em dia, é uma ameaça à saúde pública. De entre os seus vários agentes etiológicos, o vírus da Dengue é o que possui uma maior taxa de incidência em todo o Mundo. Este vírus, que pertence à família *Flaviviridae*, é constituído por uma nucleocápside envolta por uma bicamada lipídica. A nucleocápside é formada pelo genoma viral de RNA e múltiplas cópias de proteína da cápside (DenC).

Objectivos: Não havendo actualmente tratamento disponível, assume especial importância a compreensão dos mecanismos moleculares do ciclo de vida viral. Este conhecimento pode revelar-se uma mais valia no desenvolvimento de abordagens terapêuticas. Estudos anteriores sugerem a importância da DenC na encapsidação e formação de novas partículas virais e o eventual papel da interacção da DenC com membranas biológicas nestes processos. O objectivo último deste estudo é corroborar ou refutar a hipótese das membranas lipídicas, de certa forma, “catalizarem” a encapsidação.

Métodos: Investigou-se a interacção da DenC do vírus da Dengue tipo 2 (Den2C) com membranas lipídicas e os principais factores que a regulam. Realizou-se um estudo biofísico, baseado em técnicas de espectroscopia de fluorescência, dado o facto da Den2C possuir propriedades fluorescentes intrínsecas, conferida pela presença de um resíduo de Trp na sua sequência. Foram estudadas as propriedades da Den2C em solução aquosa e em interacção com sistemas modelo de membranas (vesículas unilamelares grandes, LUV) em condições semelhantes às fisiológicas. O efeito da composição dos lípidos utilizados na interacção Den2C-membrana foi de modo a proceder-se ao estudo: 1) do efeito da fase, pela utilização de lípidos na fase gel (DPPC) e na fase cristal-líquido (POPC), à temperatura ambiente; 2) do efeito da carga, pela utilização de lípidos negativos (misturas POPC/POPG e POPC/POPS, 20% POPG ou POPS); e 3) do efeito do colesterol numa mistura POPC/colesterol, 33% colesterol.

Resultados: A partição da Den2C para o interior das matrizes lipídicas ocorre essencialmente para as membranas carregadas negativamente (KP = $3.5 \times 10^3 \pm 34\%$ e $5.1 \times 10^3 \pm 23\%$ para POPC/POPG e POPC/POPS, respectivamente). A cinética de interacção com estas vesículas é muito rápida para POPC/POPS e mais lenta para POPC/POPG. Não há qualquer indício de ligação da Den2C a qualquer uma das outras vesículas lipídicas estudadas. Os resultados revelam, assim, que a natureza da interacção é essencialmente electrostática, o que está em concordância com o facto de a proteína ser carregada positivamente com carga de +23 ao pH utilizado (pH 7.4). A interacção da Den2C com membranas neutras foi também estudada através do uso da sonda de potencial dipolar de membrana, di-8-Anepps. Os resultados obtidos também não revelaram qualquer tipo de interacção da Den2C com estas membranas.

Conclusões: Membranas lipídicas aniónicas podem concentrar, na sua superfície, a Den2C e, assim, promover a encapsidação viral. Os resultados apresentados são o ponto de partida de um projecto que na sua globalidade pretende contribuir para revelar o modo como se faz a formação da cápside do vírus e o papel que as membranas lipídicas têm nesse processo.

Students: Sousa D.

Tutors: Castanho M, Veiga AS.

Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Bioquímica

Phone: 217985136 **Fax:** 217999477 **E-mail:** davidscsousa@gmail.com

Title: *The role of lipid membranes in dengue virus assembly*

Key-words: *Dengue Virus, C protein, Cell membrane.*

Background: Viral hemorrhagic fever is a clinical syndrome caused by different viruses, posing serious global health threat. Among the causative agents, dengue virus (DV) infection has the highest incidence rate and is the major cause of viral hemorrhagic fever in the world. DV belongs to the *Flaviviridae* family, which are composed by a nucleocapsid surrounded by a lipid bilayer, consisting of one copy of the genomic RNA complexed with multiple copies of the capsid protein (DenC).

Objectives: Since no treatment against DV-caused diseases is available, a detailed understanding of virus life cycle assumes a major importance. Given the essential role of capsid protein in promoting encapsidation of the viral RNA and in the assembly of virus particles, it is important to understand the structural and biophysical properties of the capsid protein and its interaction with lipids. The aim of the study is to support or refute the hypothesis that lipid membranes may “catalyze” encapsidation.

Methods: C protein from DV type 2 (Den2C) was used through the studies. First, we addressed Den2C photophysical properties in aqueous solution. Den2C is intrinsically fluorescent due to the Trp residue in its sequence. This enabled monitoring the protein partition into lipid membranes. Large Unilamellar Vesicles (LUV) were used as biologic membranes models. The effect of lipid composition on the Den2C-membrane interaction properties was studied by the use of different lipid mixtures, namely: 1) the phase effect was addressed using two lipids, POPC and DPPC; 2) the charge effect, using vesicles composed by the mixture POPC/POPG and POPC/POPS (with 20% each one); 3) the cholesterol effect, using LUV composed by mixtures of POPC/Cholesterol, with 33% cholesterol.

Results: Den2C partition into lipid membranes occurs, essentially, for negatively charged membranes ($KP = 3.5 \times 10^3 \pm 34\%$ and $5.1 \times 10^3 \pm 23\%$ for POPC/POPG and POPC/POPS, respectively). Interaction kinetics with these vesicles is very fast for POPC/POPG and slower for POPC/POPG. There is no evidence of interaction between Den2C and any of other lipid membranes studied. Therefore, we conclude that the interaction is essentially electrostatic, according with the global net positive charge of the protein (+23) at pH 7.4. Interaction of Den2C with neutral membranes was also studied using di-8-Anepps probe. Results didn't show any evidence of interaction with these membranes.

Conclusions: Anionic lipid membranes may concentrate Den2C at their surface therefore putatively triggering encapsidation. This seminal work is the basis of an extensive project that aims to contribute to understand

Alunos: Inácio RG.

Tutores: Domingues MM, Santos NC.

Laboratório, Centro ou Unidade: IMM, Unidade de Biomembranas

Telefone: 939 402 746 **Fax:** **E-mail:** rita.g.inacio@gmail.com

Título: *Avaliação da interacção da polimixina B com LPS e modelos de biomembranas por potencial zeta.*

Palavras-Chave: *Lipopolissacárido (LPS), Polimixina B (PMB), Potencial zeta.*

Fundamento: As bactérias Gram-negativas apresentam grande resistência a antibióticos devido à sua membrana externa que funciona como barreira efectiva. O LPS (lipopolissacárido ou endotoxina) é um constituinte da membrana externa destas bactérias. É constituído por 3 porções distintas, que lhe conferem diversidade estrutural: polissacárido O, região central e lípido A. Quando ocorre uma infecção grave, o LPS vai ser responsável pelo estado clínico denominado septicémia, caracterizado por inflamação geral do organismo que pode levar à morte.

A polimixina B (PMB) é um péptido antimicrobiano eficaz contra bactérias Gram-negativas, inactivando o LPS por ligação ao mesmo. Contudo, a sua utilização é limitada devido à elevada toxicidade, apesar de poder ter um papel importante no tratamento de infecções por estirpes de bactérias altamente resistentes. Assim, é fundamental o conhecimento do seu mecanismo de acção para o desenvolvimento de outros antibióticos mais eficazes, seguros e selectivos.

As medidas de potencial zeta permitem o estudo da interacção da PMB com LPS ou membranas lipídicas, avaliando a carga superficial e permitindo inferir acerca da estabilidade do sistema.

Objectivos: Estudo da interacção da PMB com agregados de LPS e sistemas modelo de biomembranas bacterianas (POPC:POPG 55:45) e de células humanas (POPC), por medidas de potencial zeta, permitindo compreender alguns aspectos do mecanismo de acção da PMB e, desse modo, potenciar o desenvolvimento de novos antibióticos.

Métodos: Prepararam-se os agregados de LPS e as vesículas lipídicas unilamelares grandes (LUV) de POPC:POPG (55:45) e POPC, dissolvendo os sólidos em tampão fosfatos e/ou PBS. Em seguida adicionou-se a PMB, mantendo as concentrações de lípido fixas, numa gama de 0 a 1,8 mM para o LPS e de 0 a 12 µM para as LUV. As amostras foram transferidas para cuvettes de potencial zeta e analisadas num equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS.

Resultados: Há medida que se adiciona maior quantidade de PMB, o potencial zeta, quer dos agregados de LPS quer das suspensões de LUV, vai aumentando. Verificou-se que existe uma maior interacção entre a PMB e as LUV de POPC:POPG (55:45) relativamente aos agregados de LPS e às LUV de POPC, embora para as duas primeiras não tenha ocorrido electroneutralização.

Conclusões: A acção antibacteriana da PMB envolve não só a interacção com agregados de LPS, formados devido à sua natureza anfipática, como também com outros componentes lipídicos da membrana externa das bactérias Gram-negativas, por forças electrostáticas e hidrófobas. Esta interacção leva à alteração do potencial de membrana o que poderá levar à desregulação de proteínas membranares. Contudo, existe também alguma interacção com as LUV miméticas de membranas de células eucarióticas, o que explica a elevada toxicidade deste fármaco.

Students: Inácio RG.

Tutors: Domingues MM, Santos NC.

Laboratory, Centre, Unit: IMM, Unidade de Biomembranas

Phone: 939 402 746 **Fax:** **E-mail:** rita.g.inacio@gmail.com

Title: *Evaluation of the interaction of polymyxin B with LPS and biomembranes model systems by zeta-potential technique.*

Key-words: *Lipopolysaccharide (LPS), Polymyxin B (PMB), Zeta-potential.*

Background: Gram-negative bacteria are resistant to a large number of antibiotics due to the effective permeability barrier function of their outer membrane. The latter is composed of lipopolysaccharide (LPS) which comprises 3 distinct components: O-polysaccharide, core polysaccharide region and lipid A. These provide the structural diversity of the LPS molecule. LPS is also the responsible by septicemia, a clinical state characterized by generalized inflammation when a severe infection occurs, that might lead to death.

Polymyxin B (PMB) is a peptide antibiotic, bactericidal to Gram-negative bacteria, that binds to LPS, decreasing its endotoxicity. However, its applications is restrained due to toxicity, but it may be important in the treatment of highly resistant strains. Hence, the knowledge of PMB mechanism of action is crucial for the development of new more efficient, selective and safer antibiotics.

Zeta-potential measurements allow the study of the interaction of PMB with LPS and lipid membranes, evaluating the surface charge and inferring about the stability of the system.

Objectives: Evaluation of the interaction of PMB with LPS aggregates and biomembranes model systems mimeting bacteria (POPC:POPG 55:45) and human cells (POPC) by zeta-potential measurements, understanding some aspects of PMB mechanism of action, in order to develop new antibiotics.

Methods: LPS aggregates and large unilamellar vesicles (LUV) of POPC:POPG (55:45) and POPC were prepared by dissolving the solids in phosphate buffer and/or PBS. Then PMB was added, maintaining the lipid concentrations, in a range of 0 to 1,8 mM for LPS and 0 to 12 µM for LUV. The samples were transferred to zeta-potential cuvettes and analyzed in a Malvern Zetasizer Nano ZS equipment.

Results: As more PMB was added, both LPS aggregates and LUV suspensions zeta-potential values increased. There was a stronger interaction between PMB and LUV of POPC:POPG 55:45 than with LPS aggregates and LUV of POPC, however, for the first two, electroneutralization did not occur.

Conclusions: The bactericidal action of PMB is related with the interaction not only with LPS aggregates, formed as a result of their amphipathic nature, but also with other lipid components of the outer membrane of Gram-negative bacteria, by electrostatic and hydrophobic forces. This interaction alters the membranes potential, which may lead to membrane proteins deregulation. Nevertheless, there is some interaction of PMB with LUV mimeting eukaryotic cells, which can explain its high toxicity.

Alunos: Fernandes L.

Tutores: Carvalho F, Santos NC.

Laboratório, Centro ou Unidade: Unidade de Biomembranas, Instituto de Medicina Molecular; Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Telefone: 217999478 **Fax:** 217999477 **E-mail:** fernandes.leonor@gmail.com

Título: *Estudo da interacção fibrinogénio-eritrócito por espectroscopia de força utilizando um microscópio de força atómica .*

Palavras-Chave: *Fibrinogénio, Eritrócito, Microscopia de Força Atómica (AFM)*

O fibrinogénio é uma proteína sanguínea multifuncional que se pode ligar à integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa), o receptor de fibrinogénio nas plaquetas, que permite a agregação destas células e a sua interacção com o endotélio lesado. Estudos feitos na Unidade de Biomembranas do IMM indicam que o fibrinogénio também se liga à membrana eritrocitária por meio de um receptor específico ainda desconhecido. A importância da GPIIb/IIIa é bem patente em indivíduos com trombastenia de Glanzmann (GT), uma síndrome hemorrágica hereditária clinicamente variável, caracterizada por ausência de agregação plaquetária devido a alterações qualitativas ou quantitativas na GPIIb/IIIa. A Microscopia de Força Atómica é uma técnica biofísica que permite por espectroscopia de força (FS) caracterizar interacções moleculares mecânicas específicas entre moléculas. Aumentos nas concentrações de fibrinogénio e da agregação eritrocitária são importantes factores de risco na trombogénese colocando a hipótese de haver uma interacção específica entre ambos. Este trabalho pretendeu estudar a interacção fibrinogénio-eritrócito por FS pela comparação da já conhecida interacção fibrinogénio-receptor GPIIb/IIIa plaquetário, em indivíduos saudáveis e com GT. Estudou-se também o efeito do envelhecimento eritrocitário na interacção destas células com o fibrinogénio.

Por FS obtiveram-se curvas de força referentes à ligação do fibrinogénio a receptores em plaquetas e eritrócitos normais e de doentes GT e também em populações eritrocitárias separadas por idades celulares quando sujeitas a um gradiente de Percoll. A partir das curvas de força construíram-se histogramas que permitem determinar o valor estatístico mais representativo da força de ligação entre uma molécula de fibrinogénio e um receptor nos dois tipos de células estudadas.

Os doentes GT apresentam uma diminuição no nº de eventos e na força de ruptura fibrinogénio-plaquetas, como esperado. A força de ruptura fibrinogénio-eritrócito é também inferior à obtida para as plaquetas, tal como ocorre em doentes saudáveis mas a amplitude desta diferença é variável. Em relação ao nº de eventos de ruptura de ligação fibrinogénio-eritrócito os resultados não são homogéneos. Metade dos doentes tem uma diminuição significativa no nº destes eventos indicando haver uma relação entre o receptor de fibrinogénio das plaquetas e dos eritrócitos. Nos restantes esta diminuição não é tão acentuada, e há um maior nº de eventos de ruptura sugerindo que o receptor de fibrinogénio dos eritrócitos nestes doentes não foi afectado pela mutação causadora da GT. Em populações de eritrócitos separadas por idades há alterações significativas nas forças e nº de ligações ao longo do envelhecimento eritrocitário.

Os resultados obtidos apoiam o AFM como meio de diagnóstico da GT e sugerem a possibilidade de previsão da sua gravidade clínica, com base no valor de força de ruptura e do nº de eventos determinado por FS. Os resultados apontam para que os dois receptores de fibrinogénio se relacionem e reforçam a possibilidade de o fibrinogénio se ligar a um receptor da família das integrinas nos eritrócitos. Ao longo do envelhecimento eritrocitário, coloca-se a hipótese dos eritrócitos contribuírem diferentemente para a trombogénese.

Students: Fernandes L.

Tutors: Carvalho F, Santos NC.

Laboratory, Centre, Unit: Unidade de Biomembranas, Instituto de Medicina Molecular; Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Phone: 217999478 **Fax:** 217999477 **E-mail:** fernandes.leonor@gmail.com

Title: *Atomic force microscopy-based molecular recognition of fibrinogen receptors in platelets and erythrocytes. Applications in health and disease.*

Key-words: *Fibrinogen, Erythrocyte, Atomic Force Microscopy (AFM).*

Fibrinogen is a multifunctional blood born protein that can bind to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb\IIIa) – the fibrinogen receptor in platelets - which allows platelet aggregation and its interaction with damaged endothelium. Studies done at Biomembranes Unit from IMM indicate that fibrinogen can bind to erythrocyte membrane through an unknown specific receptor. GPIIb\IIIa importance is underscored in patients with Glanzmann Thrombastenia, an inherited bleeding disorder with a variable clinical presentation, characterized by absence of platelet aggregation due to qualitative or quantitative GPIIb\IIIa abnormalities. Atomic force microscopy (AFM) is a biophysical technique which allows through force spectroscopy (FS) to characterize specific mechanical molecular interactions between molecules. High levels of fibrinogen and erythrocyte aggregation are important risk factors of thrombogenesis, hypothesizing that there could be a relation between them. This work aimed to study fibrinogen-erythrocyte interaction by FS comparing the well-known fibrinogen-GPIIb\IIIa platelets receptor in healthy individuals and GT patients. Erythrocyte aging effect in these interactions between fibrinogen and erythrocytes was also studied.

By FS we obtained fibrinogen-receptor force curves from both erythrocytes and platelets of normal donors and GT patients and also different age erythrocyte populations separated by a Percoll gradient. Histograms were built from force curves and allowed to attain the most representative statistic value of force bound between one fibrinogen molecule and its specific receptor in each of these cells.

As expected, GT patients presented decreased number of rupture events and forces between fibrinogen and platelets. Fibrinogen-erythrocytes binding rupture force were also lower than the ones obtained in platelets as it usually happens in healthy donors but the amplitude of difference was variable. With regards to the number of fibrinogen-erythrocyte rupture events the results were not consistent. Half of the GT patients had a significant decrease in the number of rupture events suggesting that there is a relation between the fibrinogen receptor in platelets and in erythrocytes. On the other half this decreased was not so significant and there were a higher number of rupture events suggesting that on these patients the fibrinogen erythrocyte receptor was not affected by the GT causing mutation. On the erythrocyte populations with different ages there were significant changes in forces and number of bounds through erythrocyte aging.

Taken in account the FS values of rupture force and number of events, our results support AFM as a GT diagnostic technique and suggest that it could be possible to predict the clinical severity of the disease. Our results also support a possible relation between the two fibrinogen receptors and reinforce the possibility that this fibrinogen erythrocyte receptor can be a member of the integrin family. We also hypothesize that erythrocytes with different ages could contribute in a different way to thrombogenesis.

Alunos: Sacras ML.

Tutores: Santos N, Gonçalves S.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina de Lisboa, Unidade de Biopatologia Vasculuar, Instituto de Medicina Molecular

Telefone: 217999478 **Fax:** 217999477 **E-mail:** marialuissacras@gmail.com

Título: *Estudo da interacção da Polimixina B com sistemas membranares e lipopolissacárido.*

Palavras-Chave: *Polimixina B, Lipopolissacárido, Fluorescência.*

Fundamento: O choque séptico é causado pela libertação na circulação de lipopolissacárido (LPS ou endotoxina), um componente da membrana externa de bactérias Gram negativas. A Polimixina B (PMB), um antibiótico natural obtido a partir de *Bacillus polymyxa*, é eficaz na neutralização do LPS, no entanto a sua aplicação é limitada pela sua elevada toxicidade. O desenvolvimento de análogos não tóxicos da PMB está dependente do conhecimento da interacção deste antibiótico com o LPS e com as membranas bacterianas. Sendo a Espectroscopia de Fluorescência uma técnica útil no estudo de interacções entre moléculas, o estudo da interacção da PMB em diferentes formulações lipídicas enriquecidas com LPS permitirá estimar a influência da composição membranar na interacção.

Objectivos: Estudar a interacção da PMB com membranas lipídicas enriquecidas ou não com LPS. Estimar a distância de interacção entre ambas moléculas avaliando a eficiência da transferência de energia entre LPS e PMB.

Métodos: Para os estudos de transferência de energia foram usadas soluções com uma concentração conhecida de LPS-Alexa Fluor 488, um análogo fluorescente do lipopolissacárido, às quais foram adicionados progressivamente diferentes volumes de PMB-Oregon-green 514. As amostras foram excitadas a 488 nm e os espectros de emissão foram obtidos de 500 nm a 600 nm. Para os estudos de interacção PMB com modelos de membranas, foram usadas soluções de PMB-Oregon green, às quais foram adicionadas alíquotas lipídicas de composição molar definida (POPC, POPG, POPC:LPS 80/20; POPC:POPG:LPS 45/35/20, e POPG:POPC 50/50). As constantes de partição foram calculadas ajustando os resultados experimentais à equação adequada.

Resultados: Verificou-se por FRET que a interacção LPS-PMB é muito eficiente com uma distância de interacção muito pequena entre ambas moléculas (< 90 Å). Nos estudos de partição notou-se uma diminuição da fluorescência da PMB à medida que aumenta a concentração de lípido. Este efeito deve-se a incorporação da PMB nas membranas diminuindo o rendimento quântico da mesma. A partir do gráfico I/I_w vs concentração de lípido calculou-se o coeficiente de partição entre as fases aquosa e lipídica para diferentes composições lipídicas.

Conclusões: O presente trabalho experimental permitiu verificar por FRET que a transferência de energia entre LPS e PMB é marcada e eficiente. Os estudos de partição da PMB em vesículas de diferentes composições lipídicas demonstraram que o antibiótico tem maior afinidade por sistemas membranares constituídos apenas por lípidos neutros do que por lípidos negativamente carregados.

Students: Sacras ML.

Tutors: Santos N, Gonçalves S.

Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina de Lisboa, Unidade de Biopatologia Vascular, Instituto de Medicina Molecular

Phone: 217999478 **Fax:** 217999477 **E-mail:** marialuissacras@gmail.com

Title: *Study of the interaction of polymyxin B with membrane systems and lipopolyssacharide*

Key-words: *Polymyxin B, Lipopolyssacharide, Fluorescence*

Background: The septic shock is caused by the release of lipopolyssacharide (LPS or endotoxin), a component of the outer membrane of Gram negative bacteria, to the circulation. Polymyxin B (PMB), a natural antibiotic obtained from *Bacillus polymyxa*, is efficient in the neutralization of LPS, but its use is restricted by its high toxicity. The development of non toxic PMB analogs is dependent on the knowledge of its interaction with the bacterial membrane and with the LPS itself. Fluorescence spectroscopy is useful in the study of molecular interactions. This particularity allows the study of the PMB interaction with lipid vesicles with different compositions, including LPS-enriched vesicles.

Objectives: Study the interaction of PMB with lipid vesicles, including LPS-enriched vesicles. Estimate the distance between both molecules based on the efficiency of the energy transfer between LPS and PMB.

Methods: Fluorescence intensity of the peptides Trp residues was followed upon the addition of successive aliquots of LUV to the peptide solution; different volumes of PMB- Oregon green 514 were added. The samples were excited at 488 nm and the emission spectra obtained from 500 to 600 nm. To study the interaction of PMB with the membrane models, PMB-Oregon-green solutions were used, with the addition of lipid vesicles with known molar compositions (POPC, POPG, POPC:LPS 80:20; POPC:POPG:LPS 45:35:20, e POPG:POPC 50:50). The partition coefficients were calculated by the adjusting of the experimental results to the proper equation.

Results: The FRET studies demonstrate that LPS-PMB interaction is very high and efficient, being the distance between both molecules very small (<90 Å). In partition studies, the decrease in the PMB fluorescence intensities with the increasing of lipid concentrations was noticed. The partition coefficients K_p for each lipid composition were calculated by fitting the experimental data to the appropriated equation.

Conclusions: In the present work we demonstrated that the energy transfer process between LPS and PMB is very efficient due to the proximity between both molecules (<90 Å). The partition coefficients obtained for PMB in different lipid compositions showed that PMB has higher affinity for neutral membranes than for negative charged ones.

Alunos: Carvalho A. Teixeira R.

Tutores: Casimiro S.

Laboratório, Centro ou Unidade: Unidade de Investigação em Oncologia Clínica - IMM

Telefone: 217599519 **Fax:** 217951780 **E-mail:** scasimiro@fm.ul.pt

Título: *Efeito da interação RANK-RANKL e da expressão da MMP1 na capacidade invasiva in vitro de linhas celulares de cancro da mama e da próstata.*

Palavras-Chave: *Invasão tumoral, Metástases ósseas, RANK-RANKL.*

Fundamento: As metástases ósseas são muito prevalentes em doentes com cancro da próstata ou da mama e estão associadas a elevada morbilidade e mortalidade. A remodelação óssea fisiológica consiste na deposição de osso sintetizado de novo em quantidade idêntica à de osso reabsorvido. Contudo, nas metástases ósseas existe um aumento da actividade osteoclástica, que conduz ao desenvolvimento de lesões osteolíticas. É sabido que a via de sinalização RANK-RANKL está associada à osteoclastogénese e à actividade osteoclástica. Recentemente, foi demonstrado que células de tumores da próstata e da mama, metastáticas no osso, expressam o receptor RANK. A sua estimulação com RANKL induz a migração celular e invasão de matriz de colagénio. Actualmente, a terapêutica da doença metastática avançada no osso é essencialmente anti-resorptiva, recorrendo aos bisfosfonatos. É, no entanto, necessária uma terapia mais conveniente, eficaz e segura. A inibição da via RANK-RANKL parece ser um alvo terapêutico promissor. Um potencial efeito anti-tumoral do anticorpo monoclonal denosumab, que pretende ser uma alternativa aos bisfosfonatos no grupo das terapias anti-resorptivas, poderá conduzir a um melhor prognóstico em doentes com doença metastática óssea.

Objectivos: O nosso principal objectivo foi contribuir para esclarecer o efeito da interacção RANK-RANKL no comportamento das células de cancro da próstata e da mama in vitro. Neste projecto, analisámos o efeito do knock-down dos genes RANK e MMP1 na activação de vias MAPK a jusante de RANK.

Métodos: Foram usadas as linhas celulares de cancro da próstata PC3 e da mama MDA-MB-231-B02f11, com knock-down dos genes RANK ou MMP1, respectivamente, obtido por shRNA. As células foram estimuladas com 1 µg/ml hRANKL, tendo sido obtidos extractos proteicos nucleares e citoplasmáticos aos 0, 10, 20, 40, 60 e 120 min após o estímulo. A análise da expressão das proteínas β-Actina, RANK, MMP1, p65 e da forma fosforilada e total das proteínas JNK1/2/3, ERK1/2, p38, AKT1/2/3 foi efectuada por Western Blot.

Resultados: O estímulo com RANKL da linha celular PC3, knock-down para o gene RANK, não conduziu à activação das vias MAPK ERK1/2, p38 ou AKT1/2/3, activadas na linha parental submetida ao mesmo estímulo. A via JNK1/2/3 foi activada pelo estímulo com RANKL, quer nas células knock-down quer na linha parental. O estímulo com RANKL na linha celular de cancro da mama MDA-MB-231-B02f11, knock-down para o gene MMP1, levou à activação das vias JNK1/2/3, ERK1/2, p38 e AKT1/2/3 tal como verificado na linha parental.

Conclusões: O knock-down do gene RANK na linha celular de cancro da próstata PC3 leva à não-activação das vias MAPK a jusante do receptor RANK, demonstrando que a sua activação depende da ligação RANKL-RANK. Por sua vez, o knock-down do gene MMP1 na linha celular de cancro da mama MDA-MB-231-B02f11 não afecta as vias activadas pela interacção RANK-RANKL. As linhas celulares knock-down para os genes RANK e MMP1 são de extrema importância para esclarecer o efeito do RANKL na expressão de MMP1 e na capacidade invasiva das células metastáticas

Students: Carvalho A. Teixeira R.

Tutors: Casimiro S.

Laboratory, Centre, Unit: Clinical and Translational Oncology Research Unit - IMM

Phone: 217599519

Fax: 217951780

E-mail: scasimiro@fm.ul.pt

Title: *Effect of RANK-RANKL signalling pathways and MMP1 expression in the invasive ability of breast and prostate cancer cell lines in vitro.*

Key-words: *Cancer cell invasive ability, Bone metastases, RANK-RANKL.*

Background: Bone metastases are highly prevalent and cause severe morbidity and mortality in patients with advanced breast or prostate cancer. In physiologic bone remodelling, the amount of bone resorbed is compensated by the amount of bone that is newly formed. However, in bone metastases there is an increased osteoclastic activity with consequent development of osteolytic lesions. It is well established that RANK-RANKL signalling pathways are associated with osteoclastogenesis and osteoclastic activity. Recently, it was found that bone metastatic cells from breast and prostate cancers for example, may express RANK receptor. Moreover, stimulation of these cells with RANKL induces cell migration and invasion through a collagen matrix. Despite the availability of bisphosphonates as a therapeutic option against skeletal complications of malignancy, a medical need exists for a more convenient, effective and safe therapy and the inhibition of RANK-RANKL signalling pathway seems to be a promising therapeutic target. An anti-tumoural effect of anti-resorptive drugs targeting RANK-RANKL and osteoclasts, like the monoclonal antibody denosumab, may contribute to an improved clinical outcome of patients with advanced bone metastatic disease.

Objectives: Our main purpose was to contribute to unravel the effect of RANK-RANKL on the behaviour of breast and prostate cancer cells in vitro. More specifically, we aimed to analyse the effect of RANK or MMP1 gene knock-down in the activation of RANK downstream MAPK pathways in breast or prostate cancer cell lines in vitro.

Methods: Human prostate cancer cell line PC3 and breast cancer cell line MDA-MB-231-B02f11 were used. RANK or MMP1 knock-down were performed by shRNA technique, in PC3 or MDA-MB-231-B02f11 cells, respectively. Cells were stimulated with 1 µg/ml hRANKL and nuclear and cytoplasmic protein extracts were obtained before stimulation and at 10, 20, 40, 60 and 120 min post stimulation. β-Actin, RANK, MMP1, p65, and the phosphorylated and total forms of JNK1/2/3, ERK1/2, p38 and AKT1/2/3 proteins' expression was analysed by Western Blot.

Results: RANKL stimulation of RANK knock-down PC3 cells leads to a non-activation of MAPK pathways downstream to RANK, namely ERK1/2, p38 and AKT1/2/3, pathways that are activated in parental cells following the same stimuli. JNK1/2/3 pathway shows RANKL-dependent activation, comparable to parental cells. MMP1 knock-down in MDA-MB-231-B02f11 cells does not affect RANKL-dependent activation of JNK1/2/3, ERK1/2, p38 or AKT1/2/3 pathways.

Conclusions: RANK knock-down abrogates the downstream MAPK pathways, demonstrating that they are RANKL-activated. On the other hand, MMP1 knock-down does not have any effect upstream on RANK-RANKL-activated MAPK pathways. RANK and MMP1 knock-down cell lines are important tools to assess the effect of RANK stimulus on MMP1 expression and cancer metastatic cell invasive ability.

Alunos: Branquinho A, Moreira E.

Tutores: Pimentel J.

Laboratório, Centro ou Unidade: Laboratório de Neuropatologia do HSM

Telefone: 217959329

Fax: 217959329

E-mail: josepimentel@fm.ul.pt

Título: *Caracterização Quantitativa do Gyrus Dentatus na Esclerose Mesial.*

Palavras-Chave: *Esclerose mesial temporal, Perda neuronal, Anticorpos anti-neurónios.*

Fundamento: A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia focal na população adulta, sendo causada, em cerca de 65% dos casos, por esclerose mesial (EM). A EM é caracterizada pela perda neuronal e gliose astrocitária na camada piramidal do hipocampo, principalmente no sector CA1, e na amígdala. A remoção cirúrgica do hipocampo e amígdala lesados (amigdalohipocampectomia - AHC) é uma forma de tratamento cada vez mais utilizada para esta patologia. Porém, nem sempre é possível visualizar o sector CA1 no exame histológico de peças operatórias obtidas por AHC, não se obtendo a confirmação do diagnóstico de EM. Propomos um estudo retrospectivo de fragmentos de hipocampus obtidos por AHC, com base na contagem de neurónios do sector CA4. Pretendemos correlacionar esta estrutura microscópica fácil e frequentemente identificável com o diagnóstico histopatológico de EM e definir um valor de perda neuronal a partir do qual seja possível o diagnóstico de EM, mesmo nos casos em que o sector CA1 não se encontre em condições de ser avaliado histopatologicamente.

Métodos: Estudaram-se preparações histológicas correspondentes a 40 casos de hipocampus de AHC, 30 com diagnóstico histopatológico de EM confirmado (grupo E) e 10 com diagnóstico duvidoso (grupo D). Como controlo utilizaram-se 6 casos sem patologia neurológica (grupo C) obtidos de autópsias. Foram realizadas coloração de rotina pela Hematoxilina-Eosina (HE) e imunocitoquímica (IMCQ) com anticorpo antineuronal nuclear (NeuN). Dois operadores independentes contaram, em HE para o grupo C e NeuN para os grupos E e D, o número de neurónios visíveis em 6 campos de grande ampliação (400x) do sector CA4, alinhados e orientados de acordo com a concavidade do *gyrus dentatus*. Compararam-se o número de neurónios contados por caso entre os grupos C, E e D utilizando o teste ANOVA. Repetiu-se o teste utilizando 1, 2, 3, 4 e 5 campos seleccionados aleatoriamente por cada caso.

Resultados (preliminares): Não foi detectada diferença significativa entre as contagens dos dois operadores. Verificou-se uma diferença significativa do número médio de neurónios por campo entre os grupos C e E e entre os grupos C e D ($p < 0,05$), mas não entre os grupos C e D. Quando se avaliaram 2 a 5 campos por caso, obtiveram-se valores menos significativos, enquanto com apenas 1 campo por caso não foram obtidas diferenças significativas ($p > 0,05$). As curvas ROC prevêem uma sensibilidade de 99% e uma especificidade de 83% na distinção entre os grupos C e E através da contagem de neurónios de 6 campos por caso.

Discussão: Os resultados preliminares sugerem que, mesmo que a restante porção do hipocampo não esteja preservada, é possível aplicar um critério quantitativo no diagnóstico de EM contando o número de neurónios em pelo menos 2, mas preferencialmente mais, campos de grande ampliação no sector CA4. É ainda incerto se a EM tipo 2, caracterizada por perda neuronal menos pronunciada neste sector, poderá ser detectada por este critério. O número de neurónios no grupo C pode ter sido relativamente subestimado pela elevada idade média face aos grupos E e D e pela fraca eficácia da IMCQ post-mortem com NeuN.

Conclusão: Confirmou-se a associação entre EM e perda neuronal no sector CA4. Sugerimos um critério para o diagnóstico histopatológico de EM baseado na avaliação quantitativa do sector CA4. São necessários mais estudos para explorar a utilidade prática deste critério.

Students: Branquinho A, Moreira E.

Tutors: Pimentel J.

Laboratory, Centre, Unit: HSM Neuropathology Laboratory

Phone: 217599519

Fax: 217951780

E-mail: scasimiro@fm.ul.pt

Title: *Quantitative Characterization of the Gyrus Dentatus in Mesial Sclerosis.*

Key-words: *Temporal mesial sclerosis, Neuronal loss, Anti-neurons antibodies.*

Background: Temporal lobe epilepsy (TLE), the most common form of focal epilepsy in adults, is caused by mesial sclerosis (MS) in about 65% of the cases. MS is characterised by neuronal loss and astrocytic gliosis in the hippocampus' pyramidal layer, especially in sector CA1, and in the amygdala. Amigdalohippocampectomy (AHC), the surgical excision of the injured hippocampus and amygdalae, is being used more often for the treatment of this pathology; however it is often not possible to visualize sector CA1 in the histopathological examination of tissue samples obtained by AHC, and therefore difficult to confirm the diagnosis of MS in patients treated by AHC. We propose a retrospective study of hippocampus specimens obtained by AHC, based on the neuron count of the easily and frequently identified sector CA4. Our objective is to correlate the number of neurons in sector CA4 with the diagnosis of MS and to define a cut-off point for neuronal loss at which it would be possible to diagnose MS even when sector CA1 isn't available for examination.

Methods: 40 cases of hippocampi obtained by AHC have been studied, 30 with confirmed MS diagnosis (group E) and 10 with uncertain diagnosis (group D), along with 6 controls (group C) with no known neurological pathologies obtained from autopsies. Routine staining with Hematoxylin-Eosin (HE) and imunocitoquímico staining with antineuronal nuclei antibody (NeuN) was made. Using HE for group C and NeuN for groups E and D, two independent observers counted all spottable CA4 neurons in 6 hi-power (400x) visual fields aligned with the concavity of the *gyrus dentatus*. The neuron count was compared between groups with an ANOVA, which was repeated using only 1, 2, 3, 4 and 5 randomly selected fields for each case.

(Preliminary) Results: No significant difference was detected between the results of the operators. There was a significant difference in the mean neuron count between groups C and E and also between C and D ($p < 0,05$), but not between groups E and D. Selecting 2 to 5 fields per case lowered the significance of the results, and no significant difference was noted when considering only 1 field per case ($p > 0,05$). ROC curves for neuron counts predict 99% sensibility and 83% specificity in distinguishing between groups C and E through the neuron count (6 fields per case).

Discussion: The results suggest that the neuron count of at least 2 hi-power fields (although more are recommended) of sector CA4 can be used to diagnose MS even if sector CA1 is not available. It is uncertain if a type 2 MS, which has less defined by neuronal loss in the CA4 sector, is identifiable using this method. Group C's neuron count may have been relatively underestimated due to the higher mean age and to the weaker post-mortem immunostaining with NeuN.

Conclusion: We have confirmed the association between MS and neuronal loss in CA4, upon which we suggest a histopathological diagnosis criterion for MS relying on the quantitative evaluation of sector CA4. Further studies are necessary to explore the practical utility of this criterion.

Alunos: Pires J.

Tutores: Saúde L, Fior R

Laboratório, Centro ou Unidade: IMM - UDEV

Telefone: 217999498

Fax: 217999498

E-mail: jrpires@fm.ul.pt

Título: *Estudo das diferenças entre os circuitos Notch de Inibição Lateral e Sincronização.*

Palavras-Chave: *Sinalização notch, Somitogénese, Mesogenin.*

A via de sinalização Notch é um mecanismo de comunicação célula-célula usado em vários processos biológicos desde o desenvolvimento embrionário, regulação de células estaminais assim como em situações patológicas.

Em vertebrados esta via de sinalização tem funções conservadas em processos tão diferentes quanto a neurogénese e somitogénese.

Durante a neurogénese as células que expressam o ligando Delta podem activar o receptor Notch nas células vizinhas, conduzindo à activação da transcrição dos genes que codificam as proteínas HES que, por sua vez, suprimem a actividade dos genes proneurais, mantendo assim estas células num estado não diferenciado. Desta forma, a célula que expressa o ligando Delta concretiza o seu potencial neural, diferenciando-se num neurónio, mas simultaneamente assegura que as células vizinhas não fazem o mesmo, ou seja, não se diferenciem em neurónios. Os genes HES são factores de transcrição repressores, que inibem a sua própria expressão, possibilitando o estabelecimento de feedbacks negativos.

A somitogénese é um processo extremamente preciso no espaço e no tempo, onde a cada 30 min no peixe Zebra, 90 min no ratinho e 2h na galinha é formado um novo par de somitos. Este mecanismo é regulado por um relógio molecular sob a forma de um oscilador de transcrição que actua na mesoderme pré somítica (MPS). Os genes que participam neste relógio molecular são regulados pela sinalização Delta/Notch, como por exemplo Delta C, her 1 e her 7, e exibem na MPS um padrão de expressão cíclico.

Isto significa que cada célula na MPS transcreve e degrada a mensagem codificada pelos genes cíclicos, não apenas de forma periódica, mas também em sincronia. Foi proposto que a geração das oscilações cíclicas se baseia num feedback negativo intracelular estabelecido pelos factores de transcrição – HES e por uma sinalização Notch, promovida pela activação de Delta numa célula adjacente.

Em resumo, durante a neurogénese, a sinalização Notch, através de inibição lateral, obriga as células a assumir diferentes destinos, enquanto, que durante a somitogénese, a sinalização Notch sincroniza a formação de sómitos de forma rítmica, obrigando as células vizinhas a terem o mesmo comportamento.

O que difere nestes circuitos genéticos, aparentemente semelhantes? O que pode mudar no circuito que muda o resultado final - fazer com que duas células se comportem de maneira oposta, ou fazer com que as células se comportem exactamente da mesma forma?

Estamos a investigar o papel de um factor de transcrição bHLH-Mesogenin, que poderá ser o homólogo Proneural no circuito da somitogénese e estudar a interacção entre este gene e os genes do relógio molecular. A Mesogenin pode ser a chave para estas perguntas.

Students: Pires J.

Tutors: Saúde L, Fior R

Laboratory, Centre, Unit: IMM - UDEV

Phone: 217999498

Fax: 217999498

E-mail: jrpires@fm.ul.pt

Title: *Investigating the differences between the Notch circuitries of LI and synchronization.*

Key-words: *Notch pathway, Somitogenesis, Mesogenin*

The Notch signalling pathway is a cell-cell communication mechanism used in a variety of processes ranging from embryonic development and stem cell biology to disease.

In vertebrates, the Notch pathway has conserved functions in developmental processes as different as neurogenesis and somitogenesis.

During neurogenesis, Notch signalling acts through lateral inhibition (LI) to balance the antagonistic activity of two different sets of bHLH proteins: the proneural proteins that activate neuronal differentiation and the HES protein that repress this cell fate decision. Cells that express Delta can activate the Notch receptor in neighbouring cells and this leads to transcriptional up-regulation of genes encoding HES proteins, which suppress the activity of the proneural genes and, thereby, keep these cells undifferentiated. In this way, the cell that expresses the ligand Delta realizes its neural potential, becoming a neuron, but simultaneously ensures that the neighbouring cells are prevented from doing so. HES genes are bHLH (basic-helix-loop-helix-WRPW) transcription repressors that can negatively regulate their own transcription. This enables the establishment of negative feedback-loops in HES gene regulation.

On the other hand, Notch signalling plays a very different, but essential role during somitogenesis: Notch signaling is required to keep the oscillations of neighbouring pre-somitic mesoderm (PSM) cells synchronized.

Somitogenesis is an extremely precise process in space and time, where a pair of somites is formed every 30min in the zebrafish, 90min in chick and every 2h in the mouse. The timing of somite formation is controlled by a molecular clock, in the form of a transcriptional oscillator that operates in the PSM with the same periodicity as somite formation. Most of the conserved clock genes belong to the Delta/Notch signaling pathway as *deltaC*, *her1* and *her7* and exhibit a cyclic gene expression pattern in the PSM. This means that each cell in the PSM transcribes and degrades the message and protein encoded by the cyclic genes, not only in a periodic manner but also in synchrony. It has been proposed that the generation of the cyclic gene oscillations relies in an intracellular negative feedback-loop established by the HES transcription factors on their own promoters and an intercellular loop involving Notch activation by Delta in an adjacent cell. The first loop should drive a cell-autonomous oscillation of gene expression based on a delayed feedback-loop, and the second should account for the rhythmic activation of Notch, maintaining synchrony between adjacent cells.

In summary, during neurogenesis, Notch signalling through LI, obliges cells to take up different fates, whereas during somitogenesis, Notch signalling synchronizes cells to make somites in a rhythmic manner, obliging cells to have the same behaviour.

What makes the difference between these apparent similar circuitries? What can change in the circuitry that changes the outcome –make two cells behave in opposite ways or make cells behave exactly the same way?

We are investigating the role of a bHLH transcription factor- Mesogenin, that could be the proneural counterpart of the somitogenesis circuitry and studying the interaction between this gene and the clock genes. Mesogenin might be the key for these questions.

Alunos: Baeta Baptista R.

Tutores: Infante de Oliveira E, Canas da Silva P, Rocha I.

Laboratório, Centro ou Unidade: Cardiologia (HSM) / Instituto de Fisiologia (FMUL)

Telefone: 217805309

Fax:

E-mail: rute.baebap@gmail.com

Título: *Angioplastia de tronco comum não protegido – segurança e eficácia.*

Palavras-Chave: *Stent, Revascularização, Doença Coronária.*

Fundamento: A intervenção coronária percutânea (PCI) do tronco comum tem sido reservada a doentes recusados pela cirurgia, com risco elevado para cirurgia de bypass (CABG) ou com CABG prévio e pelo menos um enxerto permeável para a artéria descendente anterior ou para a circunflexa – tronco comum “protegido”. Em virtude das novas e melhoradas técnicas de angioplastia e da disponibilização dos novos *drug-eluting stents* (DES), alguns centros de intervenção mais experientes alargaram as indicações para PCI face à CABG no tratamento da doença do tronco comum, apesar de a evidência mostrar que a CABG se mantém como a técnica standard para tratamento da maioria dos doentes. Os resultados intra-hospitalares da angioplastia são superiores aos da CABG no que concerne à incidência composta de morte, enfarte do miocárdio (EAM) e acidente vascular cerebral (AVC). Contudo, os efeitos a longo prazo são menos óbvios. Alguns estudos observacionais mostraram um aumento da taxa de revascularização com PCI, particularmente nas lesões distais, com resultados equivalentes ou ligeiramente superiores no que respeita aos eventos cardiovasculares adversos major (morte, enfarte do miocárdio e AVC). Os resultados aos 12 meses do SYNTAX trial recentemente publicados (1800 pacientes aleatorizados entre CABG e PCI com DES Taxus), revelaram taxas equivalentes de eventos major (morte, enfarte do miocárdio e AVC) e taxas de revascularização mais elevadas nos doentes tratados com PCI. Espera-se que, com base no SYNTAX, as recomendações para o tratamento da doença do tronco comum por PCI venham a ser alteradas.

Objectivos: Determinar a segurança e eficácia da angioplastia do tronco comum não protegido em condições reais num único centro de intervenção (Hospital Santa Maria – Unidade de Intervenção Dr. Joaquim Oliveira).

Métodos: Análise retrospectiva dos doentes tratados por doença do tronco comum não protegido durante cinco anos consecutivos. Definição de grupos de acordo com a opção de tratamento – terapêutica médica, angioplastia ou CABG. Follow-up mínimo de 2 anos. Morte, morte cardíaca, EAM, revascularização do vaso tratado e AVC, definem os eventos adversos cardiovasculares major. Análise dos subgrupos definidos de acordo com os factores de risco do doente, risco cirúrgico (EUROSCORE), anatomia da doença coronária (SYNTAX score), tipo de stent (DES versus stents metálicos) e técnica de implantação dos stents.

Resultados: Dos 421 doentes intervencionados entre 2002 e 2006 (5 anos) por doença do tronco comum não protegido, 33 foram submetidos a PCI e os restantes 388 foram sujeitos a CABG ou terapêutica médica. Até à presente data, concluiu-se a recolha e análise dos dados relativos ao grupo de doentes sujeitos a PCI. Considerando os endpoints precoces dos 33 doentes incluídos neste grupo, verificou-se uma morte durante o procedimento e outras 4 mortes intra-hospitalares. Aos 2 anos de follow-up, constatou-se que 11 doentes foram sujeitos a revascularização (9 por PCI e 2 por CABG), 3 tiveram enfarte do miocárdio, 1 sofreu AVC e 9 morreram (7 dos quais por causa cardiovascular). A análise dos dados relativos aos restantes doentes encontra-se ainda em curso.

Discussão: As taxas de mortalidade e revascularização estão de acordo com o elevado perfil de risco do grupo submetido a angioplastia. A análise dos restantes grupos está em curso.

Students: Baeta Baptista R.

Tutors: Infante de Oliveira E, Canas da Silva P, Rocha I.

Laboratory, Centre, Unit: Cardiologia (HSM) / Instituto de Fisiologia (FMUL)

Phone: 217805309 **Fax:** 217999498 **E-mail:** rute.baebap@gmail.com

Title: *Unprotected Left Main Trunk Stenting – Safety and Efficacy.*

Key-words: *Stent, Revascularization, Coronary Disease.*

Background: Percutaneous coronary intervention (PCI) in left main trunk disease has usually been restricted to patients considered inoperable, at high risk for coronary artery bypass-graft surgery (CABG), or with prior CABG and at least one patent graft to the left anterior descending or circumflex artery – “protected” left main trunk. With improved stenting techniques and the availability of drug-eluting stents (DES), some experienced centers have lowered the threshold for performing PCI rather than CABG for left main disease, despite evidence that CABG remains the standard of care for most patients. The in-hospital results of left main stenting are superior to those of CABG in terms of the composite incidence of death, myocardial infarction, or stroke. However, long-term benefits are less clear. Several small observational studies have pointed increased rate of target vessel revascularization with PCI – particularly in distal lesions – with equivalent or slight superior results regarding major adverse cardiac events (death, myocardial infarction, stroke). The recently presented one-year results of the SYNTAX trial (1800 patients randomized to either CABG or PCI with the Taxus DES) showed equivalent rates of hard events – death, myocardial infarction, stroke – and higher revascularization rates in PCI-treated patients. PCI guidelines for left main disease are expected to change on the basis of SYNTAX.

Objectives: Determine safety and efficacy of unprotected left main stenting in “real-world” single center (Hospital Santa Maria – Unidade de Intervenção Dr. Joaquim Oliveira).

Methods: Retrospective pool analysis of five-year consecutive patients with unprotected left main trunk disease. Define groups according with treatment option – stenting, CABG or medical therapy. Minimum follow-up of two years. Major adverse cardiovascular events defined as death, cardiac death, myocardial infarction, target vessel revascularization and stroke. Subgroups analysis according with patient risk factors, surgical risk (EUROSCORE), coronary disease anatomy (SYNTAX score), stent type (DES versus bare metal stents) and stent deployment technique.

Results: In total, 421 patients were diagnosed coronary unprotected left main trunk disease between 2002 and 2006 (5 years) - 33 underwent PCI while the other 388 performed either CABG or medical therapy. The PCI group data analysis is already complete. Early events analysis in this group revealed 1 death in the lab and other 4 intra-hospital cardiovascular deaths. Endpoints during a minimum follow-up of two years, included 11 revascularizations (9 PCI and 2 CABG), 3 myocardial infarctions, 1 stroke and 9 deaths (7 of which were cardiovascular deaths).

Discussion: The mortality and revascularization rates are according with the high risk profile presented in this group. Other patients’ data analysis is still in progress.

Alunos: Bigotte Vieira M

Tutores: Infante de Oliveira E, Canas da Silva P, Rocha I.

Laboratório, Centro ou Unidade: Cardiologia (HSM) / Instituto de Fisiologia (FMUL)

Telefone: 217805309 **Fax:** **E-mail:** mbigottevieira@gmail.com

Título: *Sobreposição de stents medicados com anti-proliferativo - Limus versus Paclitaxel.*

Palavras-Chave: *Stent, Sobreposição, Doença Coronária.*

Fundamento: O tratamento percutâneo de lesões longas bem como de doença coronária difusa requer com frequência a implantação sequencial de múltiplos stents medicados com anti-proliferativo (DES) com zonas de sobreposição. Teme-se que surjam inflamação persistente e re-endotelização retardada nos locais de sobreposição em comparação com os locais de não sobreposição, devido à toxicidade dos fármacos e à instabilidade dos polímeros. Estudos anatomo-patológicos em animais, evidenciaram aumento da inflamação e cicatrização retardada nos locais de sobreposição de DES. Clinicamente, DES sobrepostos associam-se com um maior *late lumen loss*, re-estenose angiográfica e trombose de stent mais frequentes. Em pequenas séries, análises de subgrupos de estudos clínicos randomizados e registos, a comparação de DES com stents sem fármaco evidenciou que a magnitude do benefício da redução de re-estenose com DES se mantinha apesar da sobreposição. Surgiram, no entanto, dúvidas quanto à incidência de trombose de stent.

Objectivos: Estudar a influência do tipo de fármaco antiproliferativo, sirolimus (SES) ou paclitaxel (PES) nos resultados clínicos de DES sobrepostos.

Métodos: Análise retrospectiva de doentes submetidos a angioplastia coronária com colocação de dois DES com zona de sobreposição, num período de 5 anos consecutivos (Hospital Santa Maria – Unidade de Intervenção Dr. Joaquim Oliveira). Definiram-se 2 grupos de acordo com o tipo de fármaco antiproliferativo (limus ou paclitaxel). Realizou-se um seguimento mínimo de dois anos e identificaram-se os eventos cardiovasculares major (MACE) - morte, morte cardiovascular, enfarte do miocárdio, trombose de stent, revascularização da lesão alvo, revascularização do vaso alvo, acidente vascular cerebral. Determinou-se como end-point primário a combinação dos MACE.

Resultados: Foram identificados 68 doentes no período compreendido entre 2002 e 2007 e que possuíam os critérios do estudo. Em 44 pacientes foram implantados PES sobrepostos e em 24 foram implantados SES sobrepostos. Não se identificaram diferenças significativas quanto aos principais factores de risco cardiovascular e função ventricular esquerda entre os dois grupos. Aos 24 meses, 7 doentes atingiram o end-point primário composto (SES 2 vs. PES 5, NS). Aos 48 meses, 13 doentes atingiram o end-point primário composto (SES 4 vs. PES 9, NS). Na análise individual dos MACE não se identificaram diferenças significativas aos 24 e/ou 48 meses.

Conclusões: Neste estudo, os resultados clínicos obtidos com a implantação de DES sobrepostos foi independente do tipo de fármaco anti-proliferativo (limus vs paclitaxel). O presente estudo encontra-se limitado devido à sua natureza retrospectiva, à sua não aleatorização, à dimensão limitada da amostra e à não realização de angiografia de seguimento sistemática.

Students: Bigotte Vieira M.

Tutors: Infante de Oliveira E, Canas da Silva P, Rocha I.

Laboratory, Centre, Unit: Cardiologia (HSM) / Instituto de Fisiologia (FMUL)

Phone: 217805309 **Fax:** 217999498 **E-mail:** mbigottevieira@gmail.com

Title: *Unprotected Left Main Trunk Stenting – Safety and Efficacy.*

Key-words: *Stent, Revascularization, Coronary Disease.*

Background: Percutaneous treatment of long lesions or diffuse coronary disease frequently requires the use of overlapping drug-eluting stents (DES). Concerns have been raised about persistent inflammation and delayed re-endothelialization at overlapping compared to non-overlapping sites due to drug toxicity or polymer instability. Animal pathologic studies found evidence of increased inflammation and delayed healing in overlapping DES sites. Clinically, overlapping DES are associated with greater late lumen loss, more frequent angiographic restenosis and stent thrombosis. Small series reports or subset analysis of randomized clinical trials and prospective observational studies comparing DES to bare metal stents found that the magnitude of the restenosis benefit of DES was similar in overlapping and single stents. However, concerns were raised regarding stent thrombosis.

Objectives: Study the influence of antiproliferative drug type, Sirolimus eluting stent (SES) or Paclitaxel eluting stent (PES), in clinical outcomes of overlapping DES.

Methods: Retrospective pool analysis of five-year consecutive patients submitted to coronary stenting (Hospital Santa Maria – Unidade de Intervenção Dr. Joaquim Oliveira). Define two groups of patients treated with two overlapping DES according with type of antiproliferative drug (limus or paclitaxel). Minimum follow-up of two years and the major adverse cardiovascular events were identified – death, cardiac death, myocardial infarction, stent thrombosis, target lesion revascularization, and stroke. The combination of MACE was determined as primary end-point.

Results: In total, 68 patients who received two overlapping drug-eluting stents between 2002 and 2007 (5 years) were identified, 44 of whom received overlapping PES and 24 received overlapping SES. There were no significant differences between groups regarding major cardiovascular risk factors and left ventricular function. At 24 months, 7 patients achieved the primary end-point (SES 2 vs. PES 5, NS). At 48 months, 13 patients achieved the primary end-point (SES 4 vs. PES 9, NS). There were no significant differences between groups regarding separate MACE analysis at 24 or 48 months.

Conclusions: In this study, the clinical outcomes of overlapping DES where not influenced by the type of antiproliferative drug (limus vs. paclitaxel). The present study is limited due to its retrospective nature, non-randomization, limited sample size, and lack of systematic angiographic follow-up.

Alunos: Rodrigues FAB.

Tutores: Escalda, A.

Laboratório, Centro ou Unidade: Unid. Sistema Nervoso Autónomo, Inst. de Fisiologia, FMUL

Telefone: 21799435 **Fax:** 217999436 **E-mail:**

Título: *Efeitos da estimulação da insula e do hipotálamo posterior num modelo animal de acidente vascular cerebral (AVC)- desenvolvimento do modelo animal.*

Palavras-Chave: *Modelos Animais de AVC isquémica, Artéria cerebral média (ACM), Sistema Nervoso Autónomo (SNA).*

Fundamento: O SNA é um dos grandes sistemas de controlo das funções viscerais permitindo que o organismo se mantenha em equilíbrio dinâmico com o meio que o rodeia e, também, com o seu meio interno. No seu estudo, pode usar-se a análise de Fourier permitindo esta a determinação de um espectro de potência-frequência com 2 bandas: uma relacionada com o sistema nervoso simpático, LF, e outra relacionada com o sistema nervoso parassimpático, HF. O AVC, quer seja de natureza isquémica ou hemorrágica, constitui-se actualmente, com o envelhecimento da população e com as alterações do estilo de vida, numa das patologias mais prevalentes. O AVC decorrente da isquémia da ACM é o tipo de enfarte cerebral mais frequente. Na fase aguda do AVC, para além do défice neurológico e motor há, também, modificações da actividade autonómica, todas elas induzindo várias alterações na função cardiovascular, respiratória, sudomotora e vesical que vão ser importantes no prognóstico do doente. Os modelos animais de doença são utilizados em investigação para se adquirir um melhor conhecimento dos mecanismos subjacentes a uma disfunção sem causar danos adicionais ao ser humano. O animal escolhido para o modelo deve ser, taxonomicamente e fisiologicamente, semelhante ao homem de forma a poder existir extrapolação de resultados e a etiologia da disfunção deverá ser o mais próxima da humana. Há vários modelos animais de AVC, uns provocando uma isquémia central mais difusa enquanto que outros possibilitam um maior controlo das áreas encefálicas afectadas.

Objectivos: Desenvolvimento de um modelo animal de AVC isquémico em rato, por laqueação da ACM, nas condições laboratoriais e de alojamento do Instituto de Fisiologia e USNA/IMM.

Métodos: Ratos Wistar (n=20), adultos, de ambos os sexos, anestesiados com pentobarbital de sódio (60mg/Kg,IP) e sob bloqueio neuromuscular (vecurónio, 4mg/Kg/h) foram sujeitos a craniotomia para identificação e exposição da ACM, da qual foi isolado e preparado para laqueação um ramo ântero-superior. Num primeiro grupo de animais (n=15), efectuou-se a laqueação usando sedas 8, 9 e 10 zeros. Num segundo grupo de animais, a oclusão do vaso foi efectuada por microcauterização (n=5). Em ambos os grupos, a comprovação da isquémia e do seu local foi feita com recurso a imagiologia angiográfica e dissecação anatómica.

Resultados e Conclusões: A laqueação usando sedas de diferentes diâmetros mostrou ser uma técnica que embora permitisse a desocclusão e a reperfusão, não era tão eficaz, uma vez que dada a dificuldade de acesso, o corte do vaso pelas sedas foi frequente. A microcauterização provou ser um método mais eficaz e mais rápido para a oclusão do vaso pois exigia menor exposição do encéfalo e evitava, também, a dissecação do vaso pelo que constituiu o método escolhido. No entanto, em protocolos futuros em que o modelo de isquémia-reperfusão tenha de ser considerado, o método das sedas poderá ser útil, se mais refinado.

Students: Rodrigues FAB.

Tutors: Escalda, A.

Laboratory, Centre, Unit: Unid. Sistema Nervoso Autónomo, Inst. de Fisiologia, FMUL

Phone: 21799435

Fax: 217999436

E-mail:

Title: *Effects of insula and posterior hypothalamus stimulation in an animal model of stroke – development of an animal model.*

Key-words: *Ischemic stroke animal model, Middle cerebral artery (MCA), Autonomic Nervous System (ANS).*

Background: ANS is one of the two major systems that controls visceral functions. It allows the organism to maintain the dynamic equilibrium with external environment, and also with its own internal environment. ANS signature on physiological signals can be made by the application of Fourier analysis, which allows the determination of a power-frequency spectrum with two major bands: one related with the sympathetic nervous system (LF-low frequencies) and, the second, with the parasympathetic nervous system (HF-high frequencies). Stroke, whether of ischemic or hemorrhagic nature, is nowadays, with the aging population and changes in lifestyle, one of the most prevalent pathologies. Ischemic stroke of MCA is the most common type of cerebral infarction. In the acute phase of stroke, in addition to neurological and motor deficits there are also changes in autonomic activity. These can induce several changes in cardiovascular, respiratory, sudomotor and bladder function, which will be important in the prognosis of the patient. Animal models of disease are used in research to gain a better understanding of the mechanisms underlying dysfunction without causing additional damage to humans. The animal chosen for the model should be taxonomic and physiologically similar to humans in order to be able to extrapolate the results; also, the etiology of the dysfunction should be close to that of human subjects. There are several animal models of stroke some producing a more diffuse central ischemia while others allow a greater control of the affected brain areas.

Objectives: Development of an animal model of ischemic stroke in rats by occlusion of the MCA, under the laboratory conditions of the Institute of Physiology and USNA / IMM.

Methods: Wistar adult rats (n = 20), of both sexes, anesthetized with sodium pentobarbital (60mg/kg, IP) and under neuromuscular blockade (vecuronium, 4mg/Kg/h) were subjected to craniotomy for identification and exposure of the MCA. MCA's anterosuperior branch was isolated and prepared for occlusion. In one group of animals (n = 15), this procedure was carried out using silk thread of 8, 9 and 10 zeros. In a second group of animals, occlusion of the vessel was carried out by microcauterization (n = 5). In both groups, evidence of ischemia and its location was made using angiographic imaging and anatomic dissection.

Results and Conclusions: Occlusion using silk threads of different diameters proved to be a technique that allows unclamping and reperfusion. In spite of that, it was not as effective as microcauterization because access was more difficult and silk severs the vessel more frequently. Microcauterization proved to be a more effective and faster technique of occluding the vessel because it required less exposure of the brain and avoided the dissection of the vessel. However, in future protocols and depending on the purpose, the ischemia-reperfusion model if improved could be useful.

Alunos: Sousa D.

Tutores: Escalda A, Rocha I.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Fisiologia, Unidade SNA - IMM

Telefone: 217999435

Fax: 217999436

E-mail: davidscsousa@gmail.com

Título: *Alterações Autonómicas por défice de perfusão da artéria cerebral média.*

Palavras-Chave: *Sistema nervoso autónomo, AVC isquémico, Art cerebral média.*

Fundamento: O acidente vascular cerebral(AVC) refere-se a um grupo de doenças de manifestação aguda e causadoras de défice neurológico e motor. A maioria dos AVC's é de natureza isquémica e o território da artéria cerebral média(ACM) o mais comumente afectado. Estudos anteriores mostram que na fase aguda do AVC, alterações da actividade autonómica basal poderão estar na base de algumas alterações cardiovasculares observadas nestes doentes (por ex: disritmias, enfarte do miocardio ou insuficiência cardíaca) pelo que assume especial importância a sua caracterização. A avaliação autonómica da função cardiovascular envolve a aplicação da transformada de Fourier que determina um espectro com 2 bandas principais - LF e HF - relacionadas com a actividade simpática e parassimpática, respectivamente, bem como a avaliação das alterações periféricas decorrentes da estimulação baroreflexa.

Objectivos: Num modelo animal de AVC isquémico, pretenderam-se avaliar as alterações agudas (até 1hora) da função autonómica cardiovascular.

Métodos: Em ratos Wistar (n=7), anestesiados (pentobarbital de sódio, 60mg/Kg), sob bloqueio neuromuscular (vecurónio, 4mg/kg/h) e em ventilação assistida foi feita, após craneotomia, a laqueação da ACM. Monitorizaram-se continuamente a pressão arterial (PA), o ECG e através deste, a frequência cardíaca (FC). A estimulação baroreflexa foi feita periféricamente com uma solução de fenilefrina (254g/mL) observando-se as variações de PA e FC em 3 períodos: antes da isquémia (CRT) e após isquémia, aos 10 e 40min. Para cada estimulação, calculou-se o índice do baroreflexo(BRI). A aplicação da transformada de Fourier (Marques-Neves et al, 2004) foi feita em quatro períodos após a craneotomia: antes da laqueação(CRT) e após a laqueação da ACM (aos 5, 35 e 55 min após isquémia), calculando-se os valores de LF, HF e LF/HF. Para a análise estatística foi usado o teste t-Student e consideradas significativas as diferenças quando p<0.05. No final da experiência, o animal foi morto com uma overdose de anestésico.

Resultados: Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para PA, FC, LF, HF e LF/HF entre CRT e cada um dos períodos após laqueação. No entanto, observa-se uma tendência para o aumento da actividade parassimpática ao longo do tempo, que é acompanhada pela diminuição de LF/HF, PA e FC. A análise comparativa da actividade simpática e parassimpática ao longo da experiência mostra até aos 40min, e em 5/7 animais, o mesmo padrão de resposta autonómica que, em 3/5 animais, se mantém até ao final da experiência. A variação de BRI acompanha a variação de LF/HF.

Conclusões: Conclui-se pelos resultados obtidos que é necessário o aumento da amostra para se poderem definir as alterações autonómicas na fase aguda do AVC e, em particular, se confirmarem as tendências observadas na função simpática e parassimpática.

Students: Sousa D.

Tutors: Escalda A, Rocha I.

Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Fisiologia, Unidade SNA - IMM

Phone: 217999435 **Fax:** 217999436 **E-mail:** davidscsousa@gmail.com

Title: *Autonomic changes due to middle cerebral artery perfusion deficit.*

Key-words: *Autonomic nervous system, Ischemic stroke, Middle cerebral artery.*

Background: Stroke is a major cause of mortality and morbidity in the world and refers to a group of acute diseases causing neurological and motor deficit. Most strokes (85%) are ischemic in nature and, among all vascular territories involved, the middle cerebral artery (MCA) is the most commonly affected. Previous studies have shown that in acute stroke, changes in baseline autonomic activity may underline some end organ dysfunction that is observed in these patients (eg, arrhythmias, myocardial infarction or heart failure) assuming a major importance the characterization of the consequent autonomic changes mainly those related to the cardiovascular system. The evaluation of autonomic cardiovascular function involves the application of Fourier transform (FFT) that provides a spectrum with 2 main bands - LF and HF - related to sympathetic and parasympathetic activity, respectively, as well as the evaluation of changes on blood pressure and heart rate due to peripheral baroreflex stimulation.

Objectives: In an animal model of ischemic stroke, we intended to evaluate the acute changes (up to 1 hour) of cardiovascular autonomic function related to MCA infarction.

Methods: In Wistar male rats (n = 7), anaesthetized (pentobarbital sodium, 60mg/kg), under neuromuscular blockade (vecuronium, 4mg/kg/h) and artificial ventilation, a craniotomy was performed to allow MCA ligation. Blood pressure (BP), ECG and heart rate (HR) derived from ECG were continuously monitored throughout the experiment. Baroreflex stimulation was performed peripherally, with phenylephrine (250µg/mL), observing the evoked changes in BP and HR, in 3 periods: before ischaemia (CRT) and after ischaemia, at 10th and 40th minute and the baroreflex index (BRI) was calculated for each stimulation. To evaluate sympatho-vagal balance throughout the experimental procedure, fast Fourier transform (FFT) was applied to RR signal at the following periods: before and after MCA ligation (in this case at 5, 35 and 55min after stroke) and LF, HF and the LF / HF were calculated for each period (Marques-Neves et al, 2004). For statistical analysis, Student-t test was used and differences considered significant where $p < 0.05$. At the end of the experiment, the animal was killed with an overdose of anaesthetic.

Results: Results did not show significant differences for LF, HF and LF/HF, BP and HR between CRT and the periods after MCA ligation. However, there is a trend towards an increase of parasympathetic activity, which is accompanied by a tendency of HR, BP and LF/HF ratio decrease. Also, a comparative analysis of sympathetic and parasympathetic activity over time, showed in 5/7 animals the same evolution of the autonomic (sympathetic and parasympathetic) pattern of response till the 40min after stroke that, in 3/5 animals, was maintained until the end of the experiment. BRI profile accompanies the change in LF / HF ratio.

Conclusions: In conclusion, the variation in results, offset by the trends, imposes the need to increase the sample to conclude about the acute autonomic changes evoked by stroke.

Alunos: Forno A.

Tutores: Enguita FJ.

Laboratório, Centro ou Unidade: Unidade de Biologia Celular, IMM

Telefone: 7999503 **Fax:** 217999436 **E-mail:** fenguita@fm.ul.pt

Título: *Caracterização molecular de complexos nucleares proteicos envolvidos no primeiro passo da biogénese de miRNA.*

Palavras-Chave: *miRNA, DGCR8, Microprocessador.*

Fundamento: Os miRNAs desempenham um papel crucial na regulação da expressão génica em organismos eucarióticos, sendo uma das temáticas de estudo mais recorrentes no seio da comunidade científica. Os miRNAs são produto endógeno da célula, ocorrendo a sua biogénese no núcleo, com a participação de um complexo proteico denominado “microprocessador”. Desse complexo fazem parte proteínas centrais como a DRISHA e DGCR8, capazes de reconhecer e excisar pequenos loops de RNA formados durante a transcrição. Contudo, os passos iniciais da biogénese de miRNA estão longe de serem completamente compreendidos, existindo diversas proteínas que interagem com o núcleo do microprocessador. Recentemente foram identificadas 11 proteínas que estão associadas com DGCR8-DRISHA, envolvidas fundamentalmente no processamento e transporte de RNA embora se desconheça a relação da composição do complexo do “microprocessador” e a sua funcionalidade em diferentes células.

Objectivos: Purificação de proteínas associadas com os componentes centrais do microprocessador em diferentes linhagens celulares, com conseqüente caracterização dos complexos. Desenvolvimento de métodos de purificação dos “microprocessador” em condições nativas.

Métodos: Detecção por Western Blot (WB) da presença da proteína DGCR8 em linhas celulares (modelo celular HEK293T), com imunoprecipitação a partir de anticorpos anti-DGCR8. Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade com diversos suportes activos.

Resultados: O projecto permitiu desenvolver um método para a purificação em condições nativas das proteínas do “microprocessador” envolvido na biossíntese de miRNAs. O método foi o resultado da optimização das condições de purificação do complexo proteico e foi desenvolvido com base em técnicas de cromatografia de alto rendimento para proteínas (FPLC). Diversas tentativas prévias utilizando anticorpos policlonais contra a proteína DGCR8 e proteínas com “tags” de afinidade permitiram determinar a instabilidade intrínseca dos complexos proteicos estudados.

Conclusões: O presente projecto representa um ponto de partida para a análise a larga escala dos componentes proteicos do “microprocessador”. A técnica de purificação poderá ser aplicada num futuro próximo ao estudo da composição do “microprocessador” em diferentes células, para inferir relações entre o funcionamento do complexo proteico e a sua composição.

Students: Forno A.

Tutors: Enguita FJ.

Laboratory, Centre, Unit: Cell Biology Unit - IMM

Phone: 7999503

Fax: 217999436

E-mail: fenguita@fm.ul.pt

Title: *Molecular characterization of nuclear protein complexes involved in the first steps of miRNA biogenesis.*

Key-words: *miRNA, DGCR8, Microprocessor.*

Background: Micro-RNAs (miRNAs) are key factors in the regulation of gene expression within eukaryotic organisms, being one of the “hot-spots” in the recent scientific research. miRNAs are endogenous products from the cell. Their biogenesis start at the nucleus with the help of a protein complex called “microprocessor”. DGCR8 and Drosha proteins are central core components of this complex, being able to recognize and excise small RNA loops originated from nascent mRNA transcripts. However, the initial steps of the miRNA biogenesis are far from being totally understood, because there have been characterized several additional components of the “microprocessor” complex able to interact with the protein core. Recently, 11 additional proteins were identified as accessory components of the microprocessor complex, involved in the processing and transport of RNA. Moreover, the relationship between the protein composition of the microprocessor complex and its functionality is currently unknown.

Objectives: Purification of accessory “microprocessor” components in different cell lines, with the subsequent characterization of the protein complexes. Development of purification methods for the isolation of “microprocessor” components from cells under native conditions.

Methods: Western-blot (WB) for the presence of DGCR8 protein in several cell lines (model cell line HEK293T). Immunoprecipitation of the microprocessor components using anti-DGCR8 polyclonal antibodies. Purification of proteins by affinity chromatography using several activated supports.

Results: The project allowed us to design and develop a method for the purification under native conditions of the protein components from the “microprocessor” involved in miRNA biosynthesis. The method was the result of the optimization of purification conditions, and was developed using fast protein chromatography techniques (FPLC). Several initial attempts using anti-DGCR8 antibodies for pull-down and affinity tags in recombinant DGCR8 proteins allowed us to determine the intrinsic instability of the “microprocessor” complex.

Conclusions: The current research project could be considered as a starting point for the large-scale analysis of protein components belonging to the “microprocessor” complex. Developed purification techniques could be applied in a near future to the study of the “microprocessor” composition in different cell types and to infer relationships between the protein composition and the physiology of this important protein complex.

Alunos: Charro SC.

Tutores: Marinho RT, Cruz JP, Carvalho C, Nunes J, Cabrita P, Dias I.

Laboratório, Centro ou Unidade: Unidade de Investigação em Farmacologia e Farmacogenética. Laboratório de Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas.

Telefone:

Fax:

E-mail:

Título: *Relação entre a eficácia terapêutica e as concentrações plasmáticas da ribavirina na Hepatite C crónica.*

Palavras-Chave: *Hepatite C, Ribavirina, Concentrações plasmáticas.*

Fundamento: A hepatite C crónica é uma das principais causas de cirrose e carcinoma hepatocelular. A ribavirina é um análogo da guanosina, utilizada no tratamento da infecção crónica pelo vírus da hepatite C (VHC) em associação com o interferão alfa. Apesar da eficácia terapêutica desta associação no tratamento da infecção pelo VHC, ocorre, em cerca de 10% dos casos, redução dos valores de hemoglobina. Vários estudos sugerem que a acumulação excessiva de ribavirina nos eritrócitos é responsável pela anemia e a observação de toxicidade em doentes a receber doses elevadas, quer por via oral, quer por via parentérica. Estes estudos também sugerem que a toxicidade da ribavirina está relacionada com a dose e é reversível.

Objectivos: Avaliar a relação entre a concentração plasmática mínima (Cmin) e máxima (Cmax) da ribavirina e a eficácia e toxicidade relacionada com a ribavirina, no tratamento da infecção crónica pelo VHC. Estabelecer possíveis valores de referência para a Cmin da ribavirina, de forma a poder efectuar ajustes da respectiva posologia (monitorização sérica da terapêutica) no tratamento da infecção crónica pelo VHC.

Métodos: Determinação das concentrações plasmáticas da ribavirina antes da respectiva toma (Cmin) e uma hora após a toma (Cmax) à 4ª e 12ª semana de tratamento, através do desenvolvimento e aplicação de um método analítico, utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção por ultra-violeta.

Recolha dos dados clínicos através do preenchimento de um formulário de recolha de dados (CRF), durante as consultas de acompanhamento terapêutico nas semanas 0, 4, 12, 24, 48 e 72 e semana 24 após o fim do tratamento.

Resultados: Desenvolvimento da técnica analítica: de acordo com métodos publicados na literatura, testaram-se, em duas colunas de cromatografia diferentes (Sunfire e Atlantis 4.6 x 150 mm, Waters), três fases móveis e quatro comprimentos de onda de detecção da ribavirina. O padrão interno utilizado foi o metossulfato de 3-metilcitolina. O melhor método analítico foi conseguido utilizando a coluna Atlantis, a fase móvel constituída por 100% de tampão fosfato de amónio a pH 2.5 e o comprimento de onda de detecção 207 nm. Foram incluídos no estudo até ao momento 6 doentes.

Conclusões: Até ao momento de submissão deste resumo, a escassez de doentes inseridos no estudo não permite tirar quaisquer conclusões.

Students: Charro SC.

Tutors: Marinho RT, Cruz JP, Carvalho C, Nunes J, Cabrita P, Dias I.

Laboratory, Centre, Unit: Research Unit in Laboratorial Pharmacology and Pharmacogenetics. Laboratory of Molecular Diagnosis of Infectious Diseases.

Phone:

Fax:

E-mail:

Title: *Relationship between therapeutic efficacy and plasma concentrations of ribavirin in chronic hepatitis C.*

Key-words:

Background: Chronic hepatitis C is a major cause of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Ribavirin is a guanosine analogue, used in the treatment of chronic hepatitis C virus (HCV) in combination with alpha-interferon. Published studies seem to show that treatment failure may be related to ribavirin plasma concentrations lower than those required. Moreover, around 10% of cases, there is a reduction in haemoglobin concentration due to toxic mechanisms related to ribavirin. Several studies suggest that the mechanism responsible for the anaemia is the excessive accumulation of ribavirin in erythrocytes. These studies also suggest that ribavirin toxicity is therefore related to dose and is reversible.

Objectives: To evaluate the relationship between minimum (Cmin) and maximum plasma concentrations (Cmax) of ribavirin and related effectiveness/toxicity in the treatment of chronic HCV. To establish possible reference values for ribavirin Cmin in order to be able to make dosage adjustments (therapeutic drug monitoring) in the treatment of chronic HCV.

Methods: Determination of ribavirin plasma concentrations prior to dosing (Cmin) and one hour after dosing (Cmax) at 4 and 12 weeks of treatment through the development and implementation of an analytical method, using the technique of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with ultra-violet (UV) detection.

Collection of clinical data by filling in a clinical research form (CRF) during the therapeutic follow-up visits at weeks 0, 4, 12, 24, 48 and 72, and at week 24 after treatment ending.

Results: Development of the analytical method: according to published methods in literature, two different chromatographic columns (Sunfire and Atlantis 4.6 x 150 mm, Waters), three mobile phases and four ribavirin detection wavelengths were tested. The internal standard used was the 3-methylcytidine metosulfate. The best performing analytical method was achieved using Atlantis chromatographic column, a mobile phase consisting of 100% ammonium phosphate buffer at pH 2.5 and a wavelength of 207 nm for UV detection. Until now, a total of 6 patients were included in the study.

Conclusions: By the time of this abstract submission, the scarcity of patients enrolled in the study does not allow to draw any conclusions.

Alunos: Oliveira T, Penedo C.

Tutores: Marinho CH.

Laboratório, Centro ou Unidade: Laboratório de Genética

Telefone: 217999449

Fax: 217999451

E-mail: tmr.oliveira@gmail.com

Título: *Variação Genética de Enzimas Relacionados com o Metabolismo do Óxido Nítrico e com o Processo Inflamatório na Insuficiência Renal Crônica.*

Palavras-Chave: *Insuficiência renal crônica (IRC), Arteriosclerose, Haptoglobina (Hp).*

Fundamento: A disfunção endotelial e a aterosclerose estão habitualmente presentes nos doentes insuficientes renais crónicos em hemodiálise (IRCH). A Haptoglobina (Hp), uma proteína de fase aguda, tem como função principal sequestrar a hemoglobina livre em circulação. Deste modo, ao conduzir a hemoglobina para o fígado e baço, impede a filtração desta pelos glomérulos, protegendo o rim da lesão peroxidativa. A produção da haptoglobina varia consoante o seu genótipo, sendo o genótipo 1.1 aquele que expressa a maior concentração de proteína, provocando menos reacção inflamatória a nível vascular, e o genótipo 2.2 o que expressa a menor concentração de haptoglobina.

Objectivos: O estudo do papel do polimorfismo genético da Hp (16q22) na susceptibilidade para a patologia renal crónica e a sua prevalência nos doentes que evoluem para lesão vascular, bem como a sua relação com o processo inflamatório e com o metabolismo do ferro e o metabolismo lipídico.

Métodos: Num estudo transversal, foram determinados por técnica de PAGE as variações polimórficas do gene da Hp em doentes com IRCH com e sem lesão vascular (n=122) e em dadores saudáveis (n=98).

Resultados: O alelo 2 mostrou-se predominante na população de doentes, com uma prevalência do genótipo 2.2. Estes dados são significativamente diferentes daqueles observados na população de dadores, onde existe uma prevalência do genótipo 2.1 (p=0,056). Ainda na população de doentes, observou-se uma relação significativa entre o genótipo 2.2 e níveis mais elevados de IL-6 (p=0,0007); bem como uma relação significativa entre o genótipo 2.1 e níveis elevados de GSH total plasmático e de GSHT/GSSG (p=0,006 e p=0,011, respectivamente).

Conclusões: O genótipo Hp 2.2 está relacionado com um estado inflamatório aumentado, o que se demonstra pelos níveis significativamente mais elevados de IL-6. Deste modo, este genótipo poderá ser considerado um factor de risco para a doença renal crónica e arteriosclerose. Por outro lado, demonstrou-se que os indivíduos com genótipo Hp 2.1 possuem um estado inflamatório diminuído devido aos níveis de GSH total plasmático e de GSHT/GSSG aumentados, podendo este genótipo constituir um factor de menor risco para a doença renal crónica e arteriosclerose.

Students: Oliveira T, Penedo C.

Tutors: Marinho CH.

Laboratory, Centre, Unit: Genetics Laboratory

Phone: 217999449 **Fax:** 217999451 **E-mail:** tmr.oliveira@gmail.com

Title: *Genetic Variation of Enzymes Related with the Metabolism of Nitric Oxide and the Inflammatory Process in Chronic Renal Failure.*

Key-words: Chronic renal failure (CRF), Artherosclerosis, Haptoglobin (Hp).

Background: Endothelial dysfunction and artherosclerosis are usually present in chronic renal failure (CRF) patients subject to haemodialysis. Haptoglobin (Hp) is an acute phase protein that functions primarily as a scavenger of free haemoglobin. By directing haemoglobin to the liver and spleen, Hp prevents its filtration by the glomeruli, hence protecting the kidney from peroxidative injury. The production of Hp varies in according to its genotype. The 1.1 genotype expresses the highest concentration of Hp, inciting less vascular inflammatory response, while the 2.2 genotype expresses the lowest concentration.

Objectives: Our goal is to study the genetic polymorphism of the Hp (16q22) protein and its role in CRF and associated vascular lesion. We will also study its relationship with the inflammatory process and with the iron and lipid metabolism.

Methods: In a transversal study, we studied polymorphic variations of the Hp gene by PAGE technique. The population in study consisted of CRF patients with and without vascular lesion (n=122). The control population consisted of healthy donors (n=98).

Results: The CRF population showed a prevalence of the 2 allele and the 2.2 genotype. This results were significantly different from those shown by the donor population, where the 2.1 genotype prevailed (p=0,056). We also found a significant relationship between the 2.2 genotype and higher levels of IL-6 (p=0,0007); as well as a significant relationship between the 2.1 genotype and higher levels of total plasmatic GSH and GSHT/GSSG (p=0,006 and p=0,011, respectively).

Conclusions: We observed that the Hp 2.2 genotype is related to a higher inflammatory state, demonstrated by the high IL-6 levels. Therefore, this genotype may be considered a risk factor for CRF and artherosclerosis. We also established that the individuals that possessed the Hp 2.1 genotype have a lower inflammatory state, demonstrated by their higher levels of total plasmatic GSH and GSHT/GSSG. In the same way, we may consider this genotype a protecting factor for CRF and artherosclerosis.

Alunos: Caetano AP.

Tutores: Ferreira JAA.

Laboratório, Centro ou Unidade:

Telefone: 969235945 **Fax:** **E-mail:** erihsehc@gmail.com

Título: *Influência de BRCA1 na actividade da cromatina mediada pela Topoisomerase II*

Palavras-Chave: *Topoisomerase II-alfa, BRCA1, Proteínas SUMO.*

Introdução: A topoisomerase 2 (Topo 2) está envolvida na resolução de complexos topológicos, nomeadamente nós e catenanos que surgem como resultado da replicação do DNA durante a fase S. Isto pode favorecer a condensação cromossómica na fase M e é essencial para a resolução de cromátídeos na Anafase. Durante a passagem da cadeia de DNA mediada pela Topo 2, podem formar-se intermediários transitórios ancorados às quebras de cadeia dupla do DNA, os quais são potencialmente perigosos. A estabilização destes intermediários por inibidores da Topo 2 pode convertê-los em lesões de DNA altamente citotóxicas, um fenómeno que é actualmente induzido na quimioterapia contra o cancro. Adicionalmente, evidências recentes indicam que Topo 2 interage fisicamente com o onco-supressor BRCA1, o qual influencia positivamente a actividade de decatenação da Topo 2 ao promover a sua conjugação com ubiquitina. De facto, células deficientes em BRCA1 revelam defeitos na separação dos cromátídeos semelhantes aos observados em células deficientes para Topo 2. Embora a ubiquitina e os péptidos SUMO possam competir pelo mesmo local em pelo menos alguns substratos, desconhece-se se a actividade de BRCA1 influencia a SUMO-ilação da Topo 2. Tendo em conta o papel de BRCA1 na reparação de DNA, seria relevante testar se BRCA1 afecta o destino de células afectadas por lesões de DNA mediadas por Topo 2. Na abordagem destas questões utilizei linhas celulares congénicas, competentes ou deficientes na actividade de BRCA1.

Objectivos: Testar se 1) BRCA1 é necessária para a SUMO-ilação da Topo 2, e se 2) BRCA1 influencia o destino celular após indução de lesões genotóxicas mediadas por Topo 2.

Métodos: Linhas celulares competentes e deficientes em BRCA1 foram expostas a inibidores de Topo 2 para induzir a conjugação do enzima a proteínas SUMO. Depois de processados, os homogenatos proteicos foram sujeitos a análise por Western Blot com anti-Topo 2 e anti-SUMO 1 e 2/3. Para a preparação de células para microscopia óptica e de fluorescência, as mesmas linhas celulares foram ainda sujeitas a inibidores de Topo 2, fixadas em lamelas, submetidas a anticorpos anti-SUMO 2/3 e preparadas para observação. Adicionalmente, efectuaram-se ensaios clonogénicos de sobrevivência celular para avaliar os efeitos do Etoposido em células BRCA1-.

Resultados: Linhas celulares de cancro da mama (HCC1937), competentes ou deficientes em BRCA1, foram expostas a inibidores Topo 2 para induzir a conjugação do enzima a péptidos SUMO; como controlo, utilizaram-se células não expostas. A análise por Western Blot com anticorpos anti-topo 2 e anti-SUMO 1 e 2/3 sugere que os níveis globais de SUMO-ilação da Topo 2 não são influenciados por BRCA1 em células em crescimento exponencial. No entanto, análise por imunofluorescência de células mitóticas com anticorpo anti-SUMO 2/3 indica que num contexto BRCA1- ocorre uma maior acumulação de SUMO 2/3 em resposta a drogas específicas de Topo 2. Os ensaios clonogénicos de sobrevivência revelam que BRCA1 favorece a sobrevivência celular depois das células serem induzidas a acumular lesões de DNA mediadas por Topo 2.

Conclusão: A deficiência de BRCA1 conduz a um aumento da SUMO-conjugação da Topo 2. Por fim, os resultados da análise por Western Blot, não sugerem que a ubiquitinação da Topo 2 por BRCA1 compete com a SUMO-conjugação da Topo 2.

Students: Caetano AP.**Tutors:** Ferreira JAA.**Laboratory, Centre, Unit:****Phone:** 969235945**Fax:****E-mail:** erihseh@gmail.com**Title:** *Influence of BRCA1 on Chromatin-based Topoisomerase 2 activities***Key-words:** *Topoisomerase 2, BRCA1, SUMO Proteins*

Background: Topoisomerase 2 (Topo 2) is involved in the resolution of topological complexities, namely knots and catenanes, that arise as a result of DNA replication during S phase. This may favour chromosome condensation in M phase and is essential for chromatid resolution during anaphase. Importantly, chromatid resolution by Topo 2 in M phase requires conjugation of the enzyme to the small ubiquitin-like modifiers (SUMO)-1 and -2/3. During the DNA strand passage activity of Topo 2 potentially hazardous intermediates harbouring DNA double-strand breaks are transiently formed. Stabilization of these intermediates by drugs targeting the enzyme may convert them into highly cytotoxic DNA lesions, a feature that is currently utilized in the chemotherapy of cancer. Furthermore, it was recently shown that Topo 2 physically interacts with the oncossuppressor BRCA1, and that BRCA1 positively influences the decatenation activity of Topo 2 by promoting its conjugation with ubiquitin. Indeed, BRCA1-deficient cells displayed chromatid separation defects that were indistinguishable from those seen in Topo 2 deficient cells. Although ubiquitin and the related SUMO peptides may compete for the same acceptor site on at least some substrates, it remains unknown whether BRCA1 activity influences SUMOylation of Topo 2. Also, given the role of BRCA1 in DNA repair, it would be relevant to test whether BRCA1 affects the outcome of cells harbouring Topo 2-mediated DNA lesions. I have herein addressed these issues utilizing cell lines that are congenic and either deficient or proficient in BRCA1 activity.

Aims: To elucidate whether, 1) BRCA1 is required for SUMOylation of Topo 2, and whether 2) BRCA1 influences the cellular outcome after induction of Topo 2-mediated genotoxic lesions.

Methods: BRCA1 proficient and deficient cancer cell lines were exposed to Topo 2 inhibitors to induce conjugation of the enzyme to SUMO proteins. After processing protein homogenates, they were subjected to Western Blot analysis with anti-Topo 2 and anti-SUMO-1 and 2/3 antibodies. The same genetic background cell lines were subjected to Topo 2 inhibitors, fixed, treated with anti-SUMO 2/3 antibodies and prepared for immunofluorescence analysis. Furthermore, clonogenic survival assays were done to evaluate the effects of Etoposide in BRCA1- cells.

Results: Breast cancer cells (HCC1937) either proficient or deficient in BRCA1 were exposed to Topo 2 inhibitors to induce conjugation of the enzyme to SUMO peptides; non-drug exposed cells were used as controls. Western blot analyses with anti-Topo 2 and anti-SUMO 1 and 2/3 antibodies suggest that in exponentially growing cells the BRCA1 background does not influence global levels of SUMOylation of Topo 2. However, immunofluorescence analysis of mitotic cells stained with anti-SUMO-2/3 antibodies indicates that BRCA1-deficient cells accumulate more SUMO-2/3 in response to Topo 2-specific drugs. Finally, clonogenic survival assays showed that BRCA1 favours cell survival after cells are induced to accumulate Topo 2-mediated DNA lesions.

Conclusions: BRCA1 deficiency leads to a marked increase in SUMO-conjugation of Topo 2. From the Western Blot analysis, there is no evidence suggesting that BRCA1-induced ubiquitination competes with SUMO-conjugation of Topo 2.

Alunos: Martins H.**Tutores:** Neto L.**Laboratório, Centro ou Unidade:** Instituto de Anatomia**Telefone:** 21 790 66 75**Fax:** 21 797 17 56**E-mail:** ajgonfer@fm.ul.pt**Título:** *Mapeamento dos receptores dopaminérgicos (D1 e D2) do núcleo accumbens humano - dupla marcação com imunofluorescência***Palavras-Chave:** *Núcleo accumbens, Neuroanatomia, Imunohistoquímica*

Fundamento: O Núcleo Accumbens é uma estrutura do prosencéfalo basal (parte integrante do telencéfalo) mal conhecida no cérebro humano.

Os trabalhos anteriormente realizados no Instituto de Anatomia permitiram a identificação histológica do Acc com H&E em cortes de congelação e a determinação das suas dimensões e coordenadas estereotáxicas. Posteriormente procedeu-se a um estudo histológico mais detalhado do Acc com cortes mais finos incluídos em parafina e à marcação imuno-histoquímica de receptores dopaminérgicos D1 e D2 numa tentativa de caracterizar o núcleo em diferentes sectores funcionais. No entanto, a marcação separada de D1 e D2 impediu a análise comparativa dos dois marcadores nas mesmas células tornando-se necessária uma análise mais detalhada do material e a realização de dupla marcação dos receptores para se obter um mapeamento mais preciso do Acc

Objectivos: estudo da distribuição dos dois subtipos de receptores dopaminérgicos (D1 e D2) com dupla marcação em imunofluorescência.

Métodos: Foram usados 3 cérebros adultos normais seguindo-se a mesma metodologia de colheita, fixação, dissecação, corte, coloração e digitalização informática do ano anterior. Em cada série o primeiro dos cortes foi corado com Hematoxilina-Eosina (HE), enquanto que os restantes foram incubados com anticorpos anti-D1, anti-D2 e anti-D1/D2, respectivamente. Selecção e processamento dos cortes.

Resultados e Conclusões: Foi encontrado um erro no protocolo de marcação dos receptores D1 pela técnica de imunofluorescência. Deste modo, os resultados obtidos com este marcador são o resultado de uma marcação inespecífica.

Em relação ao receptor D2 estão neste momento a ser realizadas experiências de modo a confirmar os resultados obtidos. Se a técnica for validada, a marcação dos receptores D2 apresenta resultados sobreponíveis ao ano anterior, com marcação de domínio na periferia do citoplasma.

Students: Martins H.

Tutors: Neto L.

Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Anatomia

Phone: 21 790 66 75 **Fax:** 21 797 17 56 **E-mail:** ajgonfer@fm.ul.pt

Title: *Mapping of the dopaminergic receptors (D1 and D2) of nucleus accumbens – double labeling with immunofluorescence*

Key-words: *Nucleus accumbens, Neuroanatomy, Immunohistochemistry*

Background: The Nucleus Accumbens is a basal prosencephalic structure poorly identified in humans.

The previous trials developed in the Anatomy Institute allowed the histological identification the nucleus accumbens with H&E in crio cuts and the determination of its dimensions and stereotactic coordinates. Then an more accurate histological study of nucleus accumbens was developed with imuno-histochemical labelling of the dopaminergic receptors D1 an D2 trying to characterize the nucleus in functional sectors. However the separate labelling of D1 an D2 avoid the comparative analysis of the two receptors in the same cells. A more accurate analysis was needed double labelling of there cell receptors was developed to obtain a more precise mapping of the nucleus accumbens.

Objectives: immunofluorescence double labeling of dopaminergic receptors (D1 and D2) and distribution study.

Methods: We used 3 normal adult brains following the same methodology of collection, fixation, dissection, cutting, staining and scanning computer of last year. The first section of the series was stained with haematoxylin-eosin (HE), whilst the remainder were incubated with primary antibodies D1, D2 and D1/D2, respectively. The whole data gathering process was concluded with the digitalization of and computer processing of the higher quality histological sections.

Results and Conclusions: An error was found in D1 labeling protocol by immunofluorescence technique. Thus, the results obtained with this marker are the result of an unespecific labeling.

For the D2 receptors are currently being carried out experiments to confirm the results. If the technique is validated, the labeling of D2 receptors present results overlapping with the previous year, marked predominantly at the cytoplasm periphery.

Alunos: Mourato M.

Tutores: Gonçalves Ferreira AJ.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Anatomia

Telefone: 21 790 66 75 **Fax:** 21 797 17 56 **E-mail:** ajgonfer@fm.ul.pt

Título: *Anatomia da Área Septal Pós-Comissural.*

Palavras-Chave: *Área septal pós-comissural, Núcleo accumbens, estria terminal, pedúnculo talâmico inferior.*

Fundamento: As estruturas telencefálicas subcorticais intervêm em processos como a motivação e emoções e em doenças neuropsiquiátricas como a depressão, distúrbios obsessivo-compulsivos e toxic dependência. Técnicas de neuroestimulação cerebral profunda em humanos, para terapêutica de algumas das doenças referidas, revelaram resultados equivalentes com a estimulação de diferentes estruturas como o núcleo accumbens (Acc) caudal, os núcleos da estria terminal e o pedúnculo talâmico inferior. No entanto, não existe um limite claro entre as diferentes formações que constituem esta área. Aceita-se que o limite caudal do Acc seja o limite posterior da comissura branca anterior (CBA), mas histologicamente esta zona continua-se com os núcleos da estria terminal, núcleos do hipotálamo anterior e pedúnculo talâmico inferior. Assim é fundamental conhecer os limites destas estruturas no humano devido à sua importância anatómica e funcional e pelo facto dos estudos existentes serem maioritariamente em animais de experiência.

Objectivos: Caracterização anatómica da área septal pós-comissural em cérebros humanos.

Métodos: Foram usados 3 cérebros adultos normais submetidos à mesma metodologia de colheita, fixação, dissecação, corte, coloração e digitalização informática dos anos anteriores. Os cortes foram obtidos com orientação coronal e perpendicular à linha média e à linha intercomissural, entre a região posterior do Acc e 1cm posterior à CBA. Foi efectuada a análise da área em estudo a cada 2mm (cerca de 5 níveis) quanto à organização e estrutura celular de 3 sub-áreas: área 1 – localizada na região subcomissural, junto à base do cérebro; área 2 – periventricular, abaixo do núcleo caudado e da veia tálamo-estriada; área 3 – área septal.

Resultados: Na área 1 observa-se uma camada celular disposta horizontalmente, paralela à CBA, mais próxima da base do cérebro, constituída por neurónios grandes e hiper cromáticos com núcleo à periferia, semelhantes e em continuidade com o Acc subcomissural. Posteriormente estas células diminuem em número e dimensão e estão mais dispersas. Na área 2 observa-se, da frente para trás e de dentro para fora, camadas distintas: primeiro o epêndima, depois um tecido laxo e reticulado com células pequenas e redondas organizadas de forma dispersa. Lateralmente surgem células arredondadas com núcleo central, basófilas e com grande relação núcleo/citoplasma. Inicialmente organizam-se entre a veia tálamo-estriada e a cápsula interna, passando depois a ocupar toda a espessura da área 2. Na área 3 observam-se diferentes camadas de células paralelas e simétricas em relação à linha média com diferentes graus de coloração. Algumas parecem continuar camadas de células que vêm da área 1. Numa zona mais posterior, a base do septo apresenta ilhas arredondadas ricas em feixes de fibras de substância branca.

Conclusões: A área septal pós-comissural está em continuação com o estriado ventral e o Acc. Apresenta áreas distintas com aparente comunicação entre si e células com características próprias, organizadas em núcleos. Este trabalho permitiu caracterizar a anatomia da área septal pós-comissural no cérebro humano, distinguindo os limites histológicos entre o Acc, os núcleos da estria terminal, o pedúnculo talâmico inferior e os núcleos hipotalâmicos anteriores.

Students: Mourato M.

Tutors: Gonçalves Ferreira AJ.

Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Anatomia

Phone: 21 790 66 75 **Fax:** 21 797 17 56 **E-mail:** ajgonfer@fm.ul.pt

Title: *Anatomy of the Post-commissural Septal Area.*

Key-words: *Post-commissural septal area of nucleus accumbens, Stria terminalis, Inferior thalamic peduncle.*

Background: The telencephalic subcortical structures are involved in processes such as motivation and emotion and in neuropsychiatric disorders like depression, obsessive-compulsive disorder and addiction. Deep brain stimulation techniques performed in humans for the treatment of some of the diseases reported above, have shown similar results in the stimulation of different structures such as the caudal nucleus Accumbens (Acc), the stria terminalis and the inferior thalamic peduncle. However, there is no clear limit between these different formations. It is accepted that the caudal limit of the Acc is the posterior boundary of the anterior commissure, but histologically this area is continuous with the stria terminalis, anterior hypothalamus and inferior thalamic peduncle. It is important to understand the limits between these structures in the human brain due to its anatomical and functional importance and to the fact that the only existing anatomical studies were performed in animals.

Objectives: Anatomical characterization of post-commissural septal area in the human brain.

Methods: Three normal adult brains were used, submitted to the same methods of collection, fixation, dissection, cutting, staining and computer scanning of previous studies. The slices were obtained in coronal plane, perpendicular to the mid and commissural line, between the posterior region of the Acc and 1 cm posterior to the anterior commissure. The area was analyzed every 2 mm (about 5 levels) in what concerns cellular structure and organization of 3 sub-areas: Area 1 – subcommissural, near the base of the brain, area 2 – peri-ventricular, below the caudate nucleus and thalamus striated vein, area 3 – septal area.

Results: In area 1 there is a cell layer with a horizontal arrangement, parallel to the anterior commissure, near the base of the brain, consisting of large and hyperchromatic neurons with peripheral nucleus, similar and contiguous with the subcommissural Acc. Subsequently these cells decrease in number and size and are more scattered. Area 2 shows, from anterior to posterior and medial to lateral, distinct layers: the first composed by ependyma, then a spongy and cross-linked tissue with small round cells arranged in a scattered fashion. Laterally, round basophilic cells appear, with central nucleus and large nucleus/cytoplasm ratio. Initially they are organized between the thalamo-striate vein and internal capsule and then move to occupy the entire thickness of the area 2. The area 3 shows different layers of cells, parallel and symmetrical to the midline with different color levels. Some seem contiguous to cell layers of the area 1. In a more posterior area, the septum base has rounded islands rich in fiber bundles of white matter.

Conclusions: The post-commissural septal area is contiguous to the ventral striatum and Acc. It is composed of distinctive areas that communicate with each other and cell clusters with specific characteristics. This project allowed us to characterize the post-commissural septal area anatomy in the human brain, distinguishing the histological limits between the Acc, the stria terminalis nuclei, the inferior thalamic peduncle and anterior hypothalamic nucleus.

Alunos: Campanha R, Neves P, Teixeira J.

Tutores: Gonçalves-Ferreira AJ, Regala J.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Anatomia

Telefone: 21 790 66 75 **Fax:** 21 797 17 56 **E-mail:** ajgonfer@fm.ul.pt

Título: *Marcação simultânea por imunofluorescência dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 do Locus Ceruleus Humano*

Palavras-Chave: *Locus ceruleus, Receptores dopaminérgicos*

Fundamentos e Objectivos: O Locus Ceruleus (LC) é um núcleo do tronco cerebral, cuja localização estereotáxica foi determinada em anos anteriores, no âmbito dos projectos do FML-Gapic, no Instituto de Anatomia, de modo a permitir a sua referência "in vivo" (através de Imagiologia por Ressonância Magnética ou Microcirurgia). Após a constatação de que o LC é um núcleo mais longo (± 14 mm) e estreito do que previamente descrito e estando envolvido em múltiplos circuitos neuroquímicos, iniciou-se o estudo do mapeamento dos seus neuroreceptores, por marcação imunocitoquímica. Concluiu-se que os receptores β_2 noradrenérgicos estão presentes ao longo de toda a extensão de forma homogénea e simétrica. Relativamente aos receptores D1 e D2 aplicou-se inicialmente um método de imunocitoquímica, observando-se marcação na generalidade das células do LC, em toda a sua extensão, sem aparente domínio de distribuição histológica, com uma distribuição sectorial a nível celular. Posteriormente, para confirmar estes resultados e aferir se os receptores ocupavam os mesmos sectores celulares, procedeu-se à sua marcação isolada por imunofluorescência, tendo-se observado uma distribuição da marcação dos receptores D2 sobreponível aos grânulos de melanina e uma relação inversa entre a densidade dos grânulos de melanina e a marcação dos receptores D1. No sentido de confirmar estas relações entre a intensidade da marcação dos receptores de dopamina D1 e D2 e a densidade dos grânulos de melanina, procedeu-se à sua marcação por técnica de imunofluorescência simultânea.

Material e Método: Material: 6 LC obtidos de 3 troncos cerebrais (TC) humanos adultos normais, sem antecedentes conhecidos de doença neurológica, colhidos por autópsia 48 horas post mortem e provenientes da Delegação de Lisboa do Instituto Nacional de Medicina Legal.

Método: Fixação, dissecação e inclusão em parafina dos TC; execução de cortes seriados e referenciados no micrótomato, perpendicularmente ao pavimento do IV ventrículo e à linha média; coloração dos cortes com hematoxilina; marcação por imunofluorescência com anticorpo para os receptores D1 (SP4112P) e D2 (SC-5303); observação das células marcadas com os anticorpos ao longo de toda a extensão do LC utilizando a coloração com hematoxilina como controlo histológico e citológico.

Resultados e Conclusões: Utilizando a técnica de imunofluorescência para marcação simultânea dos receptores D1 e D2, observou-se uma marcação de intensidade semelhante nos grânulos de melanina.

No protocolo de marcação dos receptores D1 foi detectado um erro na técnica de imunofluorescência.

Students: Campanha R, Neves P, Teixeira J.

Tutors: Gonçalves-Ferreira AJ, Regala J.

Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Anatomia

Phone: 21 790 66 75 **Fax:** 21 797 17 56 **E-mail:** ajgonfer@fm.ul.pt

Title: *Simultaneous immunofluorescence labelling of the D1 and D2 dopaminergic receptors of the Human Locus Ceruleus.*

Key-words: *Locus ceruleus, Dopaminergic receptors.*

Background and Objectives: The human Locus Ceruleus (LC) has been studied during the last years in this Institute of Anatomy in the scope of FML-GAPIC projects. The main objectives of such studies were the 3-D localization, the dimensions and the variability of the LC in order to allow its precise referenciation “in vivo” (by Magnetic Resonance Imaging or Microsurgery). This studies showed that the human LC is a much thinner and longer ($\pm 14\text{mm}$) nucleus than previously reported. Because the LC is an important nucleus in several neurochemical pathways we started studying the neuroreceptors mapping along the entire LC. The distribution of the $\beta 2$ -noradrenergic receptors was studied and the receptors were verified to be present along the entire length of the nucleus, symmetrically. To study the D1 and D2 receptors, we initially applied an immunocytochemistry method and observed an overall labelling of the LC cells, along the entire length of the nucleus, with no apparent histological predominance and with a cellular regional distribution. Afterwards, to confirm these results and to determine if both receptors occupy the same cellular regions, isolated immunofluorescence labelling was performed, and we observed a D2 receptor labelling that overlapped with melanin granules and an inverse relationship between the density of these granules and the D2 receptor labelling. In order to confirm this relationship between the labelling intensity of the D1 and D2 receptors and the density of the melanin granules, a simultaneous immunofluorescence labelling technique was performed.

Material and Method: Material: 6 LC from 3 normal adult human brainstems, with no known history of previous neurological diseases, collected by routine autopsy, 48 hours after death, at the “Delegação de Lisboa do Instituto Nacional de Medicina Legal”.

Method: Fixation, dissection and paraffin embedding of the brainstems; serial cutting in a microtome perpendicularly to the midsagittal and the IV ventricle floor planes; slice staining with hematoxylin; immunocytochemical labelling with an adequate antibody for the D1 (SP4112P) and D2 (SC-5303) dopaminergic receptors; observation of the cell labelling along the entire LC length, using the hematoxylin-stained cuts as histological and cytological control.

Results and Conclusions: Using the simultaneous immunofluorescence labelling technique for the D1 and D2 receptors, a labeling of the melanin granules with similar intensity was observed.

An error in the immunofluorescence procedure of D1 receptor labelling protocol was detected.

To better explain the obtained results with the D2 receptor labelling, experimental procedures to validate the protocol used are currently in progress.

Alunos: Coelho A, Alves M.

Tutores: Nicola P, Fernandes M.

Laboratório, Centro ou Unidade: Unidade Epidemiologia – IMP

Telefone: 21 799 94 22 ext. 47090 **Fax:** 21 799 94 21 **E-mail:** mepidemiologia@fm.ul.pt

Título: *Medição da Adesão à Terapêutica Anti-Hipertensiva: validação de método.*

Palavras-Chave: *Hipertensão arterial não controlada, Adesão à terapêutica, Validação.*

Fundamento: Um dos principais factores de risco associado à elevada incidência de Doenças Cardiovasculares é a Hipertensão Arterial (HTA) não controlada. Em Portugal, a HTA afecta cerca de 42% de toda a população e apenas 28,7% da população hipertensa medicada está controlada. A adesão à terapêutica anti-hipertensiva é descrita como determinante no controlo tensional e, na prática clínica, é frequente avaliar este factor através da pergunta directa ao doente. Contudo, por ser subjectivo e sujeito a viés, este método deve ser associado a outros para avaliação da adesão.

Objectivos: (1) Determinar a concordância entre a pergunta directa ao doente: “As pessoas podem falhar os seus medicamentos por muitas razões. Nos últimos 10 dias quantas tomas deve ter faltado?” e um método objectivo (contagem de unidades sobrantes) na caracterização de indivíduos como aderentes/não aderentes quanto à terapêutica anti-hipertensiva. (2) Validar a pergunta ao doente, assumindo a contagem de unidades sobrantes como método de referência.

Métodos: Até à data, participaram neste projecto 37 hipertensos medicados, previamente identificados a partir de uma amostra aleatória de 500 utentes com idade ≥ 40 anos, inscritos na USF Dafundo. Foram conduzidas duas entrevistas presenciais, com um intervalo de até 15 dias, nas quais os participantes foram questionados sobre a toma de medicação e feita a contagem de unidades sobrantes. Para cada medicamento: 1) calculou-se o índice de adesão em cada método, 2) assumiu-se que o participante seria aderente aos medicamentos que resultassem num índice $\geq 80\%$ e 3) determinou-se a concordância entre os dois métodos (estatística kappa) e a sensibilidade e especificidade da pergunta ao doente.

Resultados: Foi avaliada a adesão para 79 medicamentos de uso prolongado dos quais 46 eram anti-hipertensores. Os participantes foram classificados como aderentes para 91% e 56% dos 79 medicamentos considerados, de acordo com a resposta à pergunta e contagem, respectivamente. A concordância entre métodos foi 64,6% (kappa=0,218; IC95% 0,037; 0,399). Assumindo a contagem de unidades como referência, a sensibilidade da pergunta na avaliação da adesão é 1,00, especificidade 0,20 e valor preditivo positivo (VPP) 0,61. Considerando apenas os medicamentos anti-hipertensores, os participantes foram classificados como aderentes para 96% (pergunta) e 61% (contagem) dos medicamentos. A concordância entre métodos foi 65,2% (kappa=0,132; IC95% -0,221; 0,377) e, tendo a contagem como gold-standard, o VPP da pergunta directa ao doente foi 0,64 (especificidade 0,11), mantendo-se a sensibilidade.

Conclusões: Os resultados preliminares da avaliação da adesão pela pergunta directa parecem demonstrar fraca concordância com a contagem de unidades (referência) quanto à caracterização da adesão dos hipertensos medicados à terapêutica anti-hipertensiva. Para caracterizar melhor a adesão, é sugerida a validação desta pergunta numa amostra maior e que os resultados sejam relacionados com outras escalas de adesão.

Students: Coelho A, Alves M.

Tutors: Nicola P, Fernandes M.

Laboratory, Centre, Unit: Epidemiology Unit - IMP

Phone: 21 799 94 22 ext. 47090 **Fax:** 21 799 94 21 **E-mail:** mepidemiologia@fm.ul.pt

Title: *Anti-hypertensive therapy adherence measuring: method validation.*

Key-words: *Uncontrolled arterial hypertension, Therapy adherence, Validation.*

Background: One of the main risk factors associated to the high incidence of Cardiovascular diseases is uncontrolled Arterial Hypertension (AH). In Portugal, AH affects around 42% of the population but only 28.7% of the medicated hypertensive population has normal blood pressure (BP) values. Adherence to anti-hypertensive medication is essential to the control of BP, and in clinical practice is common to evaluate this factor by questioning the patient directly. However, because it is a subjective method and prone to bias, the question should be combined with other methods to evaluate adherence.

Objectives: (1) To determine the agreement between a subjective method for measuring adherence (question: *“People miss taking their medications for many reasons. Do you have medicines for which you sometimes miss taking a dose? (..) How many doses might you have missed in the past 10 days?”*), and an objective one (pill-count) in the characterization of subjects as adherent or non-adherent to anti-hypertensive therapy; (2) to validate the question, assuming pill-count as gold-standard method.

Methods: Until now, 37 medicated hypertensive subjects have entered the study. They were randomly selected among a 500 sample, aged ≥ 40 years old, from patients followed at USF Dafundo. Two interviews were conducted, spaced by a maximum period of 15 days. In these interviews, patients were asked about their medication-taking regimen and pill-count was conducted. For each drug: 1) adherence index for each method was calculated; 2) participants were considered adherent to medication if index presented higher than 80%; and 3) agreement between both methods (kappa statistics), as well as sensitivity and specificity of the question to patient concerning adherence, were determined.

Results: Adherence was determined for 79 chronic drugs, 46 of them being anti-hypertensive. The participants were considered adherent for 91% and 56% of the 79 drugs, according to the answer to the question and pill-count, respectively. Agreement between methods was 64.6% (kappa=0.218; IC=95% 0.037, 0.399). Assuming pill-count as gold-standard, question sensitivity in the evaluation of adherence is 1.0, specificity 0.2 and positive predictive value (PPV) 0.61. Considering only the anti-hypertensive drugs, participants were classified as adherents for 96% (question) and 61% (pill-count) of the drugs. Agreement was 65.2% (kappa=0.132; IC95% -0.221, 0.377), with the question's PPV 0.64 (specificity 0.11), sensitivity being the same.

Conclusions: Preliminary results from evaluation of adherence by direct questioning to the patient seem to demonstrate poor agreement with pill-count in characterizing adherence to anti-hypertensive medication. To better characterize adherence, we suggest the validation of this question in a larger sample and the correlation of results with other adherence measuring scales.

Alunos: Lavinhas C.

Tutores: Nicola P, Fernandes M.

Laboratório, Centro ou Unidade: Unidade de Epidemiologia – IMP

Telefone: 21 799 94 22 ext. 47090 **Fax:** 21 799 94 21 **E-mail:** mepidemiologia@fm.ul.pt

Título: *Identificação de Hipertensos Medicados nos Cuidados de Saúde Primários – Comparação de Métodos de Amostragem*

Palavras-Chave: *Hipertensão arterial, Análise de concordância, Cuidados de saúde primários*

Fundamento: A Hipertensão Arterial (HTA) atinge mais de 50% da população portuguesa acima dos 45 anos e é factor de risco para a doença isquémica cardíaca e doenças cerebrovasculares, respectivamente a terceira e a quinta causa de anos potenciais de vida perdidos. Os Cuidados de Saúde Primários são responsáveis pelo controlo da maioria das situações de HTA, sendo essencial estudar os factores associados ao controlo desta doença crónica, neste nível de cuidados de saúde. Para tal, é necessário decidir entre as várias fontes disponíveis para a identificação de hipertensos medicados.

Objectivos: 1) comparar o grau de concordância entre dois processos de identificação de hipertensos medicados (entrevista telefónica ao doente e questionário ao médico de família); 2) verificar qual dos processos permite identificar maior número de hipertensos medicados com menor ausência de informação e 3) identificar vantagens e desvantagens inerentes a cada processo.

Métodos: Os participantes foram seleccionados aleatoriamente da lista de utentes inscritos na Unidade de Saúde Familiar (USF) do Dafundo, com idade ≥ 40 anos, assegurando-se grupos de 100 utentes por médico de família. Foram aplicados os dois processos de identificação de hipertensos medicados a todos os participantes. Um utente foi considerado “identificado” quando classificado como hipertenso medicado pelo menos por um dos processos. A análise estatística, com recurso ao software R, incluiu a estatística de concordância e de kappa.

Resultados: Os 500 utentes seleccionados, de 5 médicos da USF, tinham média de idades de 57,1 \pm 11,7 anos e 52,4% eram mulheres. O questionário ao médico foi preenchido para 50% dos utentes, em cerca de 2 semanas. As entrevistas telefónicas foram conduzidas entre Abril e Setembro 2009, tendo sido conseguidas em 245 (49%) participantes. Nos 500 utentes, 23,2% (n=116) foram identificados como sendo hipertensos medicados por, pelo menos, um dos processos, com 55 (46,6%) identificados pelo médico e 99 (85,3%) em entrevista telefónica pelas afirmações de “ter HTA” ou “já ter tido HTA” e toma actual de anti-hipertensor(es). Quando analisados apenas os utentes com informação dos dois processos (n=106, 21,2%), 47 (44,3%) foram identificados como hipertensos medicados por, pelo menos, um dos processos, dos quais 40 (85,1%) foram identificados pelo médico e 45 (95,7%) em entrevista telefónica. A concordância entre processos foi excelente (kappa=0,82; IC95% 0,71-0,93).

Conclusões: Os resultados deste estudo indicam que a entrevista telefónica é o processo que permite identificar maior número de potenciais hipertensos medicados. As limitações deste processo prendem-se com a dificuldade e morosidade no contacto telefónico. Para o processo de identificação pelos médicos a principal desvantagem é a dificuldade na participação, por indisponibilidade ou por considerarem que a informação está disponível de forma mais automática nos processos clínicos electrónicos. A comparação destes dois processos com a identificação a partir da consulta directa dos processos clínicos electrónicos está actualmente a ser estudada.

Students: Lavinias C.

Tutors: Nicola P, Fernandes M.

Laboratory, Centre, Unit: Unidade de Epidemiologia – IMP

Phone: 21 799 94 22 ext. 47090 **Fax:** 21 799 94 21 **E-mail:** mepidemiologia@fm.ul.pt

Title: *Identification of Medicated Hypertensive Patients at Primary Health Care Centres - comparison between different data collection methods.*

Key-words: *Hypertension, Agreement analysis, Primary health care.*

Background: Hypertension affects more than 50% of the Portuguese population over 45 years old. Hypertension is a risk factor for ischemic heart and brain vascular diseases, the third and fifth causes for potential years of life lost in Portugal, respectively. The Primary Health Care is responsible for controlling most of the hypertension situations. The study of factors associated with the control of this chronic disease at this health care level is essential. Therefore, it is necessary to decide which of the different sources of information to identify the medicated hypertensive patients should be used.

Objectives: i) to compare the agreement between two methods for the identification of medicated hypertensive patients (patient telephone interview and physician questionnaire); ii) to verify which process allows the identification of most of the medicated hypertensive patients with less information loss and iii) to identify advantages and limitations of each method.

Methods: Participants were randomly selected from the list of users of the Family Health Care Unity (USF) of Dafundo, with age ≥ 40 years, ensuring groups of 100 patients per physician. The two methods to identify the medicated hypertensive patients were intentionally applied to all participants. A patient was considered “identified” when at least in one of the methods was identified as a medicated hypertensive patient. The statistical analysis using the software R included the kappa statistic and agreement statistics.

Results: 500 patients were selected from 5 USF’s physicians, with an average age of 57.1 ± 11.7 years and 52.4% females. Physicians’ questionnaires were filled for 50% of the patients, during about 2 weeks. Phone interviews were conducted between April and September 2009 and were successful for 245 (49%) of the participants. From the 500 patients, 23.2% (n=116) were identified as medicated hypertensive patients by at least one of the methods. 40 patients (37.7%) were identified by the physician and 99 (85.3%) identified by the phone interview by acknowledging that “have hypertension” or “have had hypertension” and currently take anti-hypertensive(s) medication. Analysing only the patients with information from both methods (n=106, 21.2%): 47 (44.3%) were identified as a medicated hypertensive patients at least for one of the methods; 40 patients (85.1%) were identified by the physician; and 45 (95.7%) by phone interview. The agreement between both methods was excellent (kappa=0.82; CI 95%: 0.71-0.93).

Conclusions: The results indicate that phone interview to the patient is the method that allows identifying most of the potential medicated hypertensive patients. The limitations of this method are the difficulties in obtaining phone contact and the fact of being a time-consuming approach. For the physician questionnaire method, the principal limitation is the time-availability of the physician for participation and the physician’s reluctance since they consider that the information is more automatically available through the electronic medical records. The comparison between the two methods analysed and the identification of the medicated hypertensive patients from direct queries to the electronic medical records is being studied at the moment.

Alunos: Matos TR.

Tutores: Cardoso JRM.

Laboratório, Centro ou Unidade: Unidade da Biologia da Cromatina (IMM)

Telefone: 21 7999519 **Fax:** **E-mail:** tiagoreismatos@gmail.com

Título: *Validação molecular de possíveis reguladores do fenótipo de Senescência Acelerada.*

Palavras-Chave: *Cancro, Senescência acelerada, Perfis de expressão.*

Fundamento: A senescência acelerada (SA) é uma forma de senescência celular que surge em consequência de determinados tipos de stress (ex.: lesões do DNA, encurtamento dos telómeros, stress oxidativo, sobre-expressão de oncogenes, etc.). Dados experimentais actuais comprovam que as células senescentes podem constituir uma barreira à proliferação descontrolada de células mutantes ou danificadas e consequentemente ao aparecimento de cancro. Embora a senescência seja regulada por duas importantes vias supressoras de tumores (p53 ou pRb) é surpreendente que células malignas, onde ocorre frequentemente a perda de pelo menos um dos reguladores principais, mantenham a capacidade de entrar em SA após estímulo genotóxico induzido por quimioterapia anti-cancerígena. Tal indica que existem mecanismos adicionais ainda desconhecidos capazes de regular a SA. Dada a complexidade da SA, um dos possíveis mecanismos é o splicing alternativo (SAlt) de pré-mRNAs. Apesar da importância do SAlt como fonte de diversidade proteica, o qual tem o potencial de contribuir para a regulação da SA, desconhece-se presentemente a contribuição do SAlt na indução da SA.

Objectivos: O projecto proposto tinha por objectivo a validação de genes diferencialmente expressos (GDEs) e de eventos de SAlt (ESAs) cujas alterações de expressão podem ser associadas à indução e manutenção e fenótipos de SA após exposição a drogas anti-cancerígenas genotóxicas.

Métodos: GDEs e ESAs previamente seleccionados foram validados usando RT-PCR semi-quantitativo (RT-PCRsq). Alguns GDEs foram posteriormente validados por RT-PCR quantitativo de fluorescência (PCR-RTq).

Resultados: A análise prévia das alterações transcripcionais e de SAlt associadas à SA após exposição a um inibidor de topoisomerase I utilizando um microarray dedicado à detecção de SAlt permitiu seleccionar GDEs e ESAs para validação.

Ao nível dos GDEs, quer o RT-PCRsq quer o RT-PCRq confirmaram os resultados obtidos por microarray. Entre os GDEs validados e associados a SA estão sobre-expressos genes responsáveis pela resposta ao stress (TP53INP1, SERPINB5), sinalização por citocinas (IFIT1, IFI27) e um importante regulador do ciclo celular (CDKN1A) indicando que as células se encontram num estado de paragem.

Por outro lado, genes responsáveis pela remodelação da cromatina (EZH2), reparação/metabolismo do DNA (BRCA1, DNAPKcs, WRN, BUB1) e pela proliferação/sinalização celular (MET) mostraram estar sub-expressos. A validação do SAlt por RT-PCRsq confirmou alguns dos ESAs (ex.: DNAPKcs, IFI27) mas em vários casos os complexos padrões de splicing revelados, implicaram uma análise mais sofisticada.

Conclusões: Ambas as abordagens de RT-PCRsq e RT-PCRq permitiram-nos validar a maioria dos GDEs seleccionados, mas a quantificação mais precisa foi obtida por RT-PCRq. Por fim, através de RT-PCRsq foi possível visualizar ESAs associados ao fenótipo de SA. Conjuntamente com resultados previamente obtidos *in silico*, as validações aqui apresentadas reforçam o provável papel activo que estes genes terão na SA, uma ideia a ser explorada com maior detalhe através de estratégias de análise funcional.

Students: Matos TR.

Tutors: Cardoso JRM.

Laboratory, Centre, Unit: Unit of Chromatin Biology (IMM)

Phone: 21 7999519

Fax:

E-mail: tiagoreismatos@gmail.com

Title: *Molecular Validation of candidate regulators of Accelerated Senescence phenotypes.*

Key-words: *Cancer, Accelerated senescence, Expression profiling.*

Background: Accelerated senescence (AS), is a form of cellular senescence triggered by distinct types of stresses caused such as DNA damage, telomere attrition, oxidative stresses, oncogene overexpression, and suboptimal culture conditions. There is now sound evidence that senescence cells (SC) provides a barrier to uncontrolled proliferation of aberrant or damaged cells and thus to the emergence of cancer. Indeed, SC is now envisaged as a major tumor suppressor mechanism. Consistent with this view, senescent cells are abundant in pre-malignant lesions at stages when oncogene overexpression is already detectable. Disappearance of senescent cells highlights the emergence of full-blown malignancy, thus supporting the concept of SC as a tumor suppressor mechanism. What is surprising is that malignant cells, which in most cancers have lost at least one of the major gatekeeper tumor suppressors (p53 or pRb), may still be induced to enter a senescent state (accelerated senescence/AS) after genotoxic insult induced by anti-cancer chemotherapy. Despite its growing importance, the gathered data on AS still only traces an imprecise molecular portrait of a complex and multileveled cellular outcome and therefore it remains currently unknown which metabolic signatures might allow prediction of senescence as an outcome of anti-cancer therapy.

Objectives: The proposed project was aimed at validating selected genes whose expression changes can be associated to the establishment and maintenance of AS phenotypes emerging after exposure to anti-cancer drugs that elicit extensive DNA damage.

Methods: Raw or normalized microarray data was previously downloaded from web-based public repositories or obtained directly from the authors. Bioinformatic analysis procedures were carried out on the R platform and included: data preprocessing, normalization, statistical modeling of distinct variables and selection of candidate sets of biologically relevant genes across datasets. Then two main techniques have been used: A) The semi-quantitative PCR and B) Fluorescent-based quantitative RT-PCR (qRT-PCT). qRT-PCT shall be used given that is presently considered the most reliable method for the quantitative detection of mRNA. Due to its high sensitivity and easy usage it will a straightforward comparison between RNAs that differ widely in their abundance.

Results: Genes responsible for stress response (TP53INP1, SERPINB5) and cytokine signalling (IFIT1, IFI27) are upregulated in SC. It was seen that CDKN1A, a major cell cycle regulator is also upregulated, indicating that the cells are in cell cycle arrest. On the other hand, the genes responsible for chromatin remodelling (EZH2), DNA metabolism/repair (BRAC1, DNAPKcs) and for cell signalling/proliferation were shown to be downregulated.

Conclusions:

Alunos: Chora Sousa A, Marques Paixão R.

Tutores: Martins Baptista A, Rocha I.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Fisiologia da FMUL

Telefone:

Fax:

E-mail: isabelrocha@fm.ul.pt

Título: *Avaliação da função autónoma humana após um AVC isquémico ao nível da artéria cerebral média.*

Palavras-Chave: *AVC, Avaliação do SNA, Imagiologia.*

Fundamento: O AVC é uma das causas mais relevantes de morbidade e mortalidade. 85% dos AVCs é de natureza isquémica sendo o território mais frequentemente afectado o da artéria cerebral média (ACM), que é responsável pela irrigação das zonas corticais que estão envolvidas no controlo autonómico. Estudos anteriores mostram que alterações do SNA durante a fase aguda do AVC constituem factor de risco de complicações cardiovasculares a médio e longo prazo (p.e.: EAM, IC e disritmias). A avaliação não invasiva do SNA envolve a aplicação da transformada de Fourier a variáveis cardiovasculares permitindo a determinação de um espectro com duas bandas principais de frequências: baixas frequências - LF (0.15–0.4 Hz) relacionadas com a actividade simpática e altas frequências - HF (0.04–0.4 Hz), devidas a actividade parassimpática.

Objectivos: Avaliar o comportamento do SNA através da medição da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão de pulso em doentes com suspeita de AVC em fase aguda e sub-aguda.

Métodos: Foram incluídos neste estudo 7 doentes (H=3, M=4) com média de idades de 77±14 anos que deram entrada na urgência do HCC com suspeita de AVC. O protocolo de trabalho consistiu em recolher durante 10 minutos o registo basal de ECG e a pressão de pulso em dois períodos: durante as primeiras 24h a seguir à admissão (fase aguda) e até uma semana após esta data (fase sub-aguda). A suspeita de AVC da ACM era confirmada por critérios imagiológicos sendo os doentes classificados em 2 grupos: AVC isquémico (GI, n=4) e hemorrágico (GH, n=2). Num dos doentes avaliados, o diagnóstico não foi conclusivo. Na análise de resultados, aplicouse a transformada rápida de Fourier a ambas as variáveis (Task Force ESC 1996), calculando-se LF, HF e LF/HF. Para comparação foi utilizada uma população controlo (PC) constituída por indivíduos normais (n=16) de igual distribuição de sexos e com média de idades 55±17 anos. Para análise estatística foi utilizado o teste t-Student e consideradas significativas as diferenças para p<0.05. Os dados são expressos como média ± desvio-padrão.

Resultados: Na fase aguda, os valores de LF (ms²), HF (ms²) e LF/HF para os grupos GI, GH e PC são respectivamente 6378±8780.1, 16198±14211.9, 0.7±0.17; 1018±479.6, 2441±2100.9, 0.6±0.34; 657±143.3, 349±85.1, 2.6±0.55. Foram encontradas diferenças significativas apenas entre PC e GI, e entre PC e GH. Por artefactos decorrentes do movimento não controlado dos doentes, a análise da pressão de pulso foi excluída. A avaliação na fase sub-aguda não foi possível por constrangimentos vários.

Conclusões: Observa-se uma função autonómica aumentada com predomínio parassimpático nos 2 grupos de doentes por comparação com o controlo, o que é reflectido pela relação LF/HF. Este facto pode ser devido à terapêutica pré-existente, à instituição no momento da admissão e/ou às áreas centrais afectadas pela lesão. Dado o carácter preliminar deste estudo, para conclusões mais precisas, é necessário o aumento do número de doentes da amostra.

Students: Chora Sousa A, Marques Paixão R.

Tutors: Martins Baptista A, Rocha I.

Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Fisiologia da FMUL

Phone: **Fax:** **E-mail:** isabelrocha@fm.ul.pt

Title: *Human autonomic evaluation after an ischemic insult at the level of the medial cerebral artery.*

Key-words: *Stroke, Autonomic valuation, Imagiology.*

Background: Stroke is one of the most relevant causes of morbidity and mortality. 85% of strokes are of ischemic nature, and the most frequently affected territory is the one of the medial cerebral artery (MCA), which is responsible for the irrigation of the cortical areas involved in the autonomic control. Previous studies indicate that changes of the ANS during the acute phase of the stroke represent a risk factor for middle- and long-term cardiovascular complications (e.g.: stroke, heart failure and dysrhythmia). The noninvasive evaluation of the ANS involves the application of the Fast Fourier Transform to cardiovascular variables, allowing the determination of a spectrum with two major frequency bands: low frequencies – LF (0.15 – 0.04 Hz), related to the sympathetic activity, and high frequencies – HF (0.04 – 0.4 Hz), due to parasympathetic activity.

Objectives: To evaluate the behavior of the ANS through measurement of the variability of cardiac frequency and pulse pressure in patients with suspicion of stroke in the acute or sub-acute phases.

Methods: These studies take into consideration seven patients (M=3, F=4) with 77±14 years of average age, who gave entrance in HCC's Emergency Room with suspicion of stroke. The work protocol consisted of collecting, for 10 minutes, the basal register of the ECG and the pulse pressure, in two periods: during the first 24 hours following the patient's admission (acute phase), and until a week after this date (sub-acute phase). The MCA stroke suspicion was confirmed by imagiological criteria, and patients were divided into two groups: ischemic stroke GI (n=4) and hemorrhagic stroke GH (n=2). One of the considered patients had an inconclusive diagnosis. In results analysis, the Fast Fourier Transform has been applied to both variables (Task Force ESC 1996), and the values of LF, HF and LF/HF calculated. By way of comparison, a control group PC composed by normal individuals, of equal sex distribution and 55±17 years of average age, has been used. For the statistical analysis, the t-Student test was used, and differences of $p < 0.05$ were considered relevant. The data is expressed as median ± standard deviation.

Results: In the acute phase, the LF (ms²), HF (ms²) and LF/HF for the GI, GH and PC groups are respectively, 6378±8780.1, 16198±14211.9, 0.7±0.17; 1018±479.6, 2441±2100.9, 0.6±0.34; 657±143.3, 349±85.1, 2.6±0.55. Significant differences were found, only between PC and GI, and between PC and GH. Due to artifacts caused by patients' non-controlled movements, pulse pressure analysis was excluded. The evaluation of the sub-acute phase was not allowed in consequence of restrictions of service.

Conclusions: It was detected an increased autonomic function in the two patient groups, by comparison with the control group, with parasympathetic predomination in both of them, which is reflected by the LF/HF relation. This fact can be derived from the pre-existent medication, instituted at the moment of admission, and/or from the lesion-affected areas. For more conclusive results, it is necessary to increase the number of patients of the sample.

Alunos: Zhang D.

Tutores: Jacinto A, Simões MG.

Laboratório, Centro ou Unidade: Unidade de Morfogénese e Reparação de Tecidos, IMM

Telefone: 217999515 **Fax:** 217999504 **E-mail:**

Título: *O papel da re-inervação na regeneração da barbatana do peixe zebra.*

Palavras-Chave: *Nervos, Regeneração, Peixe Zebra.*

Fundamento: Os Invertebrados e algumas espécies vertebradas têm a notável capacidade de regenerar alguns dos seus órgãos e tecidos enquanto adultos. Ultimamente, tem crescido o interesse em estudos moleculares e genéticos sobre regeneração em Peixe zebra (*Danio rerio*), um teleósteo que apresenta uma enorme capacidade para regenerar diversos órgãos, incluindo as barbatanas. Após amputação, o primeiro passo da regeneração é a cicatrização da ferida, um processo não proliferativo que gera uma epiderme especializada que cobre a área amputada, chamada *apical epidermal cap* (AEC). O tecido mesenquimatoso sob a AEC desdiferencia-se e acumula-se para formar uma população proliferativa de células mesenquimatosas indiferenciadas, o Blastema, crucial para o processo regenerativo e sem o qual este não ocorre. Dentro de 1/2 semanas, as interações estabelecidas entre a AEC e o Blastema asseguram a regeneração completa da barbatana. A formação do Blastema é controlada por diversos factores, incluindo a inervação das estruturas a regenerar. Foi demonstrado em anfíbios e outros peixes que após remoção das fibras nervosas, a regeneração dos membros não ocorre, sendo afectada a proliferação do blastema, mas não as subsequentes fases de crescimento e reorganização da estrutura. Pensa-se que os axónios libertam determinados Factores de Crescimento Mitogénicos (FCM), estimulando a proliferação das células do blastema e controlando a expressão de genes importantes para um processo regenerativo eficaz. Devido à facilidade de manipulação molecular e genética, o peixe zebra proporciona um sistema modelo de excelência para estudar o papel dos nervos no processo de regeneração das barbatanas e para investigar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes, maioritariamente desconhecidos devido às limitações na manipulação molecular e genética dos modelos previamente estudados, como por exemplo os anfíbios.

Objectivos: 1) Desnervar a barbatana peitoral do peixe zebra e analisar o impacto na sua regeneração; 2) Investigar se a fase de re-epitelização da regeneração ocorre normalmente em barbatanas desnervadas. 3) Estudar a sinalização e a proliferação em barbatanas desnervadas.

Métodos: 1) A inervação da barbatana peitoral esquerda de peixes zebra adultos foi removida cirurgicamente, servindo a direita como controlo. 24 horas depois, ambas as barbatanas foram amputadas e deixadas a regenerar. As barbatanas foram re-amputadas em diversos tempos pós-amputação e as amostras fixadas para análise histológica. Para confirmar a desnervação das barbatanas realizou-se imunohistoquímica (IHC) contra α -tubulina acetilada em ambas as barbatanas. 2) Observaram-se amostras de tecidos fixados corados com Faloidina e DAPI ao microscópio óptico e confocal. Analisaram-se igualmente os padrões de expressão do *lef1*, um gene que se sabe estar expresso na AEC. 3) Utilizaram-se diferentes sondas de RNA para analisar os padrões de expressão de diferentes genes que se sabem estar presentes durante a regeneração, como o *msxb*, *mip1* e *Shh*. Realizaram-se ainda IHC contra PCNA para estudar a divisão celular em barbatanas desnervadas.

Resultados e Conclusões: Os resultados obtidos confirmam a necessidade de inervação apropriada para ocorrer regeneração das barbatanas. Estes procedimentos permitirão descrever com mais detalhe a dinâmica da dependência nervosa da regeneração e investigar o papel de FCM putativos e seus alvos, utilizando as ferramentas moleculares disponíveis no peixe zebra.

Students: Zhang D.**Tutors:** Jacinto A, Simões MG.**Laboratory, Centre, Unit:** Tissue Morphogenesis and Repair Unit, IMM**Phone:** 217999515**Fax:** 217999504**E-mail:****Title:** *The role of re-innervation in zebrafish fin regeneration.***Key-words:** *Nerves, Regeneration, Zebrafish.*

Background: Invertebrates and some vertebrate species have the remarkable capacity of regenerating many organs and tissues during adulthood. Recently, increasing attention has been paid to molecular and genetic studies of regeneration in Zebrafish (*Danio rerio*), a teleost that presents tremendous capacity to regenerate several organs, including its fins. Upon amputation, the first step of fin regeneration is wound healing, a non-proliferative event that yields a multilayered wound epidermis covering the stump, called apical epidermal cap (AEC). Mesenchymal tissue beneath the AEC then dedifferentiates and cells accumulate to form a population of proliferative undifferentiated mesenchymal cells, called Blastema, which is crucial to the regenerative process and without which it fails to occur. Within 1/2 weeks, the interactions established between the AEC and the Blastema ensure the outgrowth of a new fin. The formation of the Blastema is under the control of different factors, including the nerve fibres that innervate the appendages. It has been shown in amphibians and other fish that upon nerve fibre removal, fin/limb regeneration does not occur properly, affecting the proliferation in the blastema (although they are not required to the subsequent phases of patterning or differentiation). Axons are thought to release what has been called Mitogenic Growth Factors (MGF) into the amputated limbs/fins, thereby stimulating the proliferation of blastemal cells and up-regulating genes important for an effective regenerative process. Because of its amenability to molecular and genetic manipulation, zebrafish provides an excellent model system to address the role of nerve fibres in the process of fin regeneration and to investigate the cellular and molecular mechanisms behind it, which are largely unknown due to limitations to molecular and genetic manipulation in the model organisms that have been previously studied, such as amphibians.

Objectives: 1) Practice nerve removal in zebrafish pectoral fins and analyse its impact in fin regeneration; 2) Investigate if re-epithelisation phase of regeneration occurs normally in denervated fins; 3) Study the expression of signalling and proliferation in denervated fins.

Methods: Wild-type adult zebrafish were used. 1) The left pectoral fin innervation was surgically removed, and the right one served as a control. After 24 hours, both pectoral fins were amputated and allowed to regenerate. At different time points, fins were re-amputated and regenerates fixed for histological analysis. To confirm fin denervation we performed an immunohistochemistry (IHC) against the acetylated α -tubulin in both fins. 2) We have accessed for normal wound healing analysing fixed tissues stained with Phalloidin and DAPI under bright field and confocal microscopy. We have also analysed the expression patterns of *left1*, a gene that is known to be expressed in the AEC of regenerating fins. 3) We used different RNA probes to analyse expression patterns of different genes that are known to be present during blastema formation, patterning and outgrowth, such as *msxb*, *mps1* and *Shh*. We also performed PCNA IHC to investigate the number of cell division present in denervated fins.

Results and Conclusions: Our results confirm the necessity of proper innervation for fin regeneration to occur. These procedures will allow us to describe in more detail the dynamics of nerve dependence and investigate the role of putative MGFs and its targets, by studying their expression and function, using the molecular tools available in zebrafish.

Alunos: Pereira da Silva SB.**Tutores:** Sousa AE.**Laboratório, Centro ou Unidade:** U. Imunologia Clínica IMM/ Serviço Imunoalergologia HSM**Telefone:** 217999521**Fax:****E-mail:** sarabps@sapo.pt**Título:** *Imunodeficiência Comum Variável: Patogénese da Activação Imunológica Crónica.*

A Imunodeficiência Comum Variável (IDCV) é a imunodeficiência primária com expressão clínica mais frequente. O diagnóstico de IDCV baseia-se numa diminuição quantitativa e qualitativa da produção de anticorpos. Para além dos distúrbios de linfócitos B, a IDCV associa-se frequentemente a alterações dos linfócitos T, nomeadamente um aumento dos níveis de activação celular, a complicações não infecciosas como auto-imunidade e linfoproliferação e a um risco aumentado de linfoma. Embora a frequência e a gravidade das infecções sejam habitualmente controladas com a terapêutica de substituição com imunoglobulina G, a patologia não infecciosa mantém-se como a principal causa da morbidade na IDCV.

Neste projecto, investigámos mecanismos de activação imunológica crónica que possam estar subjacentes às complicações não infecciosas. Foram estudados 31 doentes, dos quais 90% apresentam autoimunidade e/ou linfoproliferação. Tal como previamente descrito, estes doentes apresentaram uma diminuição da frequência das células B de memória com switch de imunoglobulinas (CD27+IgD-) e uma expansão de células B com fenótipo sugestivo de activação, denominadas por CD21low (CD21lowCD38low).

O défice de produção de IgA nas mucosas que caracteriza a IDCV levou-nos a colocar a hipótese de que a activação imunológica crónica em doentes com IDCV fosse em parte devida à existência de translocação bacteriana aumentada, com a consequente estimulação persistente por produtos bacterianos como o lipopolissacárido (LPS), tal como foi anteriormente sugerido no contexto dos distúrbios das mucosas associados à infecção por HIV. No entanto, documentámos uma ausência de aumento dos níveis circulantes de LPS nos doentes com IDCV relativamente a indivíduos saudáveis. Uma vez que o controlo dos níveis circulantes de LPS é em parte efectuado por anticorpos anti-LPS, foi investigada a possibilidade de a terapêutica de substituição se associar a níveis circulantes significativos de anticorpos anti-LPS, hipótese que foi confirmada pela quantificação de anticorpos anti-LPS, quer nos soro dos doentes, quer nos lotes de imunoglobulina G usados na terapêutica endovenosa e subcutânea.

A interleucina 17 (IL-17) é uma citocina pró-inflamatória que tem sido implicada em patologia inflamatória e autoimune, nomeadamente na doença de Crohn. Dada a elevada proporção de doentes com IDCV com manifestações autoimunes (~70%), colocámos a hipótese de existir neste contexto um aumento da produção de IL-17. Verificámos que a frequência de células produtoras de IL-17 na população de linfócitos T CD4 não se encontrava aumentada nos doentes com IDCV, mesmo no subgrupo com autoimunidade. Além disso, verificámos que, em oposição a outras citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , a frequência de células produtoras de IL-17 diminuía com o aumento dos níveis de activação celular T, e que os distúrbios dos linfócitos B, nomeadamente a expansão da população CD21low, se associavam a uma diminuição da frequência da população produtora de IL-17 nos linfócitos T CD4. Observámos ainda que, em doentes com defeitos no desenvolvimento dos linfócitos B levando a uma ausência total de linfócitos B (agammaglobulinemia associada a mutação do gene BTK), a frequência de células produtoras de IL-17 se encontra ainda mais reduzida. Estes achados levaram-nos a investigar a relação entre linfócitos B e a população T CD4 produtora de IL-17 em indivíduos saudáveis. Verificámos que a frequência de células B de memória com switch de imunoglobulinas está directamente associada com a frequência de células T CD4 produtoras de IL-17. Tal facto suporta a existência de uma relação entre a diferenciação de linfócitos B e a homeostasia de linfócitos T CD4 produtores de IL-17, cuja investigação poderá elucidar alguns mecanismos imunopatológicos e de resposta a terapias biológicas moduladoras dos linfócitos B.

Students: Pereira da Silva SB.

Tutors: Sousa AE.

Laboratory, Centre, Unit: U. Imunologia Clínica IMM/ Serviço Imunoalergologia HSM

Phone: 217999521 **Fax:** **E-mail:** sarabps@sapo.pt

Title: *Imunodeficiência Comum Variável: Patogénese da Ativação Imunológica Crónica.*

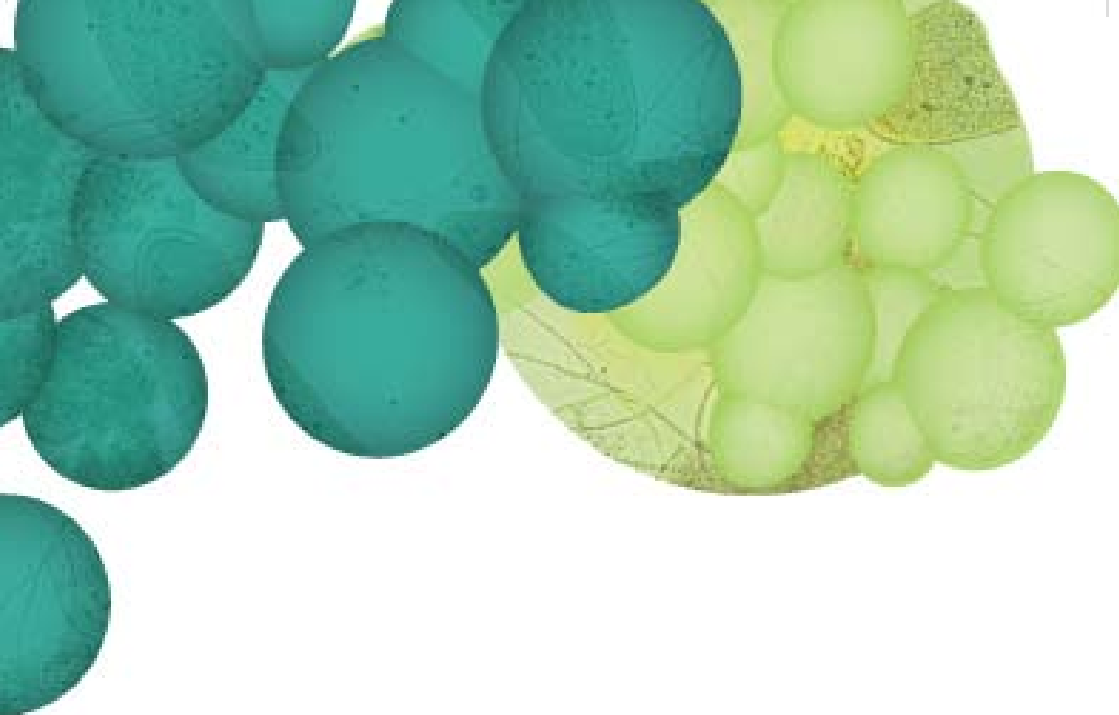
Common Variable Immunodeficiency (CVID) is the most frequent primary immunodeficiency with clinical relevance. Quantitative and qualitative reductions in antibody production are the hallmark of CVID diagnosis. Besides B cell disturbances, CVID is frequently associated with T cell imbalances, namely increased levels of cellular activation, non infectious complications, as autoimmunity and lymphoproliferation, and an increased risk of lymphoma. Replacement therapy with immunoglobulin is usually efficient in the control of infectious complications, although, non infectious manifestations remain the main cause of morbidity in CVID.

In this project, we investigated possible mechanisms contributing to chronic immune activation, possibly implicated in the non infectious complications.

We studied 31 patients, 90% of which presented autoimmunity and/or lymphoproliferation. As previously found, our group of patients presented a reduction in switched memory B cells (CD27+IgD-) and an expansion of a B cell subpopulation with an activated phenotype, named CD21low (CD21lowCD38low).

The deficiency of mucosal IgA production that characterizes CVID lead us to hypothesize that chronic immune activation in CVID could be in part related to increased bacterial translocation, with consequent persistent immune stimulation by bacterial products such as lipopolysaccharide (LPS), as has been previously suggested in the context of the mucosal disturbances associated to HIV infection. We found an absence of increase in the circulating LPS levels in CVID patients as compared with healthy controls. Circulating LPS levels are in part controlled by anti-LPS antibodies. We hypothesized that immunoglobulin replacement treatment could be associated with significant levels of anti-LPS, which was confirmed by the quantification of anti-LPS antibodies in patient's plasma as well as in the preparations of immunoglobulin used in intravenous and subcutaneous therapy.

Interleukin 17 (IL-17) is a pro-inflammatory cytokine that has been implicated in several inflammatory and autoimmune diseases, such as Crohn's disease. Given the high proportion of CVID patients with autoimmune manifestations (~70%), we hypothesized that IL-17 production could be increased in this context. We found that the frequency of IL-17 producing cells within the CD4 T lymphocytes was not increased in CVID, even in the subgroup of patients with autoimmune manifestations. Moreover, in contrast with other pro inflammatory cytokines, as IFN- γ and TNF- α , the frequency of IL-17 producing cells decreased in parallel with the increase in T cell activation levels and with the expansion of CD21low subpopulation in CVID patients. We further observed that patients with B cell development defects leading to absence of circulating B cells (agammaglobulinemia due to BTK gene mutations), showed a striking reduction in the frequency of IL-17 producing cells within the CD4 T cell subset. These findings lead us to investigate the relationship between B lymphocytes and IL-17 producing CD4 T cells in healthy individuals. We found a direct association between the frequency of switched memory B cells and the frequency of IL-17 producing cells within CD4 T cells. Overall, these data support a link between B cell differentiation and homeostasis of IL-17 producing CD4 T cells, which investigation may elucidate mechanisms implicated in the response to immune-based therapies targeting B cells.



Organização

Gabinete de Apoio à Investigação Científica,
Tecnológica e Inovação

Coordenação

Prof. Doutor João António A. Ferreira
Prof. Doutora Ana Espada de Sousa
Prof. Doutor João Eurico da Fonseca
Prof. Doutor João M. Forjaz Lacerda

Contactos

Mestre Sónia Godinho Barroso
Edifício Egas Moniz - Piso 0 - Sala 10
Av. Prof. Egas Moniz 1649-028 Lisboa
Ext.: 47006 | tel.: 21 799 94 20 | fax: 21 799 94 18
E-mail: gapicmail@fm.ul.pt

