# Livro de Resumos

Prémio GAPIC David-Ferreira

23.º Workshop "Educação pela Ciência" | Bolsas CHULN/FMUL

Research Paths

## 9ª edição DIA da INVESTIGAÇÃO

CENTRO ACADÉMICO DE MEDICINA DE LISBOA

U LISBOA | UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA LISBOA

30 ANOS 1989-2019 GAPIC Gabinete de Apoio à Investigação Científica, Tecnológica e Inovação

aefml associação de estudantes da faculdade de medicina de lisboa

# INTRODUÇÃO

Bem-vindos à **9ª edição do DIA da INVESTIGAÇÃO**, uma iniciativa do GAPIC e da AEFML.

No **DIA da INVESTIGAÇÃO** homenageamos a atividade científica desenvolvida pelos alunos da FMUL e pelos médicos em início de carreira, divulgando os seus trabalhos e estimulando o debate sobre investigação científica no seio da comunidade do CAML.

Este ano em versão online serão apresentados os resultados dos projectos desenvolvidos no âmbito do 23.º Programa "Educação pela Ciência" | Bolsas CHULN/FMUL (2019/2020) e entregues os Prémios GAPIC David-Ferreira destinados aos melhores Trabalhos Finais /Teses do MIM em 2019/2020. Devido à pandemia pelo SARS-CoV2, foi prorrogada a execução de alguns projectos, sendo a discussão dos resultados já obtidos e dos planos experimentais futuros seguramente muito útil para o seu desenvolvimento e para reforçar a comunicação entre os investigadores, particularmente importante neste contexto.

No **DIA da INVESTIGAÇÃO** debatemos também os múltiplos caminhos para conectar a Medicina e a Investigação.

Este ano, o Prof. Tiago Oliveira irá partilhar a experiência de 14 anos do programa MD/PhD da Escola de Medicina da Universidade do Minho. Hoje director do programa, foi também o seu primeiro doutorando. Este é o único programa formal em Portugal de realização do doutoramento durante o MIM.

O Prof Ricardo Fernandes apresentará a experiência do GAPIC ao longo dos 31 anos de existência (criado a 11 de Julho de 1989), com particular enfâse no impacto do Programa "Educação pela Ciência" que, ininterruptamente desde há 24 anos, avalia e financia anualmente projectos de investigação desenvolvidos pelos alunos da FMUL.

O **DIA da INVESTIGAÇÃO** será seguramente muito estimulante!

A Ciência está sempre ON, claro!

**A Equipa do GAPIC**

# *INTRODUCTION*

*Welcome to the 9th edition of "**DIA da INVESTIGAÇÃO**", a joint initiative of GAPIC and AEFML.*

*"**DIA da INVESTIGAÇÃO**" pays tribute to the scientific activity developed by FMUL students and young physicians, discussing their work and stimulating the debate regarding scientific research within the CAML community.*

*This year the results of projects developed under the 23rd edition of Programa "Educação pela Ciência" (2019/2020) will be presented online. Due to the SARS-CoV2 pandemic several projects have been extended, and the discussion of the preliminary results and the planned experiments will be very useful for their success, and to reinforce investigators communication.*

*The Prémio GAPIC David-Ferreira will also be attributed to the best Medical Student Master Thesis 2019/2020.*

*"**DIA da INVESTIGAÇÃO**" is also devoted to the debate of the many paths to link Medicine and Research.*

*This year, Prof. Tiago Oliveira will share the experience along the 14 years of the MD/PhD program of the Escola de Medicina da Universidade do Minho. He was the firs PhD student and he is currently the Director of this unique program in Portugal that supports the development of a PhD thesis within the medical course.*

*Prof Ricardo Fernandes will present the GAPIC experience since 1989. He will particularly focus on the impact of the Program "Educação pela Ciência", which in the last 24 years without interruptions, promotes the evaluation and funding of research projects developed by FMUL students.*

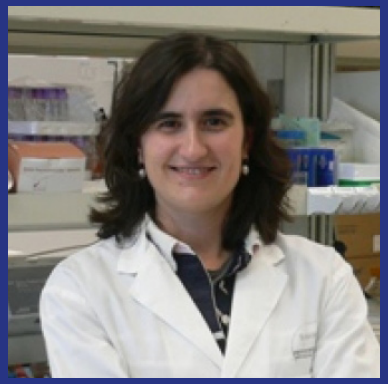
*It will be a very stimulating "**DIA da INVESTIGAÇÃO**"!*

*Science is always ON!*

***The GAPIC Team***

## EQUIPA COORDENADORA

Prof.ª Doutora Ana Espada de Sousa | Coordenadora



Prof.ª Doutora Cláudia Faria
Vogal

Prof. Doutor Ricardo Fernandes
Vogal

Prof.ª Doutora Susana Fernandes
Vogal

## ASSESSORIA E SUPORTE TÉCNICO ADMINISTRATIVO

Mestre Sónia Barroso
Assessora

Mestre Carla Araújo

Paula Mouro Ferreira

# 23º Programa Educação pela Ciência
# Bolsas CHULN/FMUL

# Sessão de Posters I

PAINEL

Catarina Mota | Daniel Caldeira | Dulce Brito | Jorge Ruivo | Patrício Aguiar*

*A aguardar confirmação

**Alunos** | Students: Adriana da Fonseca Vazão

**Tutores** | Tutors: Ana Catarina Fonseca

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Clínica Universitária de Neurologia

**E-mail:** adrianavazao@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **BCHULN/01**

**Título: Avaliação do controlo da pressão arterial como medida de prevenção secundária em doentes pós-AVC**

Title: Evaluation of blood pressure control as a secondary prevention measure in post-stroke patients

**Palavras-Chave:** Acidente vascular cerebral; hipertensão; prevenção secundária

**Resumo:**

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é uma importante causa de morbi-mortalidade a nível global. A hipertensão é o fator de risco com maior impacto na incidência de AVC. O controlo da hipertensão, como medida de prevenção secundária, contribui para a diminuição da recorrência de eventos cardiovasculares (incluindo AVC). Ainda não foi estabelecido qual o alvo de pressão arterial (PA) ideal em prevenção secundária e *guidelines* de diferentes organizações divergem no valor recomendado. A nível europeu há poucos dados sobre o controlo da PA em doentes que sofreram um AVC e os que existem têm, pelo menos, 5 anos. O objetivo deste estudo é perceber se, numa *cohorte* de doentes portugueses, após um AVC, os doentes apresentam ou não pressão arterial controlada.

Métodos: Pacientes com >18 anos admitidos com diagnóstico de AVC (confirmado por imagiologia), inseridos na base de dados PRECISE-Stroke entre Janeiro de 2017 e Maio de 2020. Foi avaliada a PA destes doentes à alta hospitalar, 3 meses e 12 meses pós-alta. Posteriormente foi feito um estudo comparativo do controlo da PA ao longo do período de follow-up.

Resultados: 357 doentes (42,3% do sexo feminino) foram incluídos neste estudo, com idade média de 66 anos, dos quais 75,4% tinham PA controlada à alta hospitalar. Aos 3 e 12 meses pós-AVC a percentagem de doentes controlados desce para 52,9 e 51%, respetivamente. Em termos evolutivos apenas 32,6% dos doentes tinham PA controlada em todas as avaliações. Uma limitação a este trabalho foi a perda de follow-up durante os 12 meses pós-AVC, com apenas 56% de doentes a comparecer a ambas as consultas.

Conclusão: A percentagem de doentes com PA controlada foi superior à reportada em estudos prévios, mas há ainda margem para melhorar este controlo.

Key-Words: Stroke; hypertension; secondary prevention

Abstract:

Strokes represent a major cause of morbidity and mortality worldwide. Hypertension is the risk factor with the greatest impact in stroke incidence. Blood pressure (BP) control, as a secondary prevention measure, has a substantial effect on diminishing recurrence of vascular events (stroke included). The optimal BP target in secondary stroke prevention is still controversial and different guidelines from diverse organizations recommend different targets. Data available on risk factors control in European countries is limited and, at least, 5 years old. This study's objective was to assess in a cohort study whether, in Portugal, patients who recently suffered a stroke have controlled BP.

Methods: Adult patients (age >18 years) admitted with a diagnosis of stroke (imagological confirmed), included in the PRECISE-Stroke study online database between January 2017 and May 2020. Patients had their BP assessed on discharge, 3 months and 12 months post-stroke. Posteriorly, we conducted a comparative study of BP control throughout the 12-month follow-up period.

Results: 357 patients (42,3% female) were included in this study, mean age of 66 years old. 75,4% of them had controlled BP at discharge. 3- and 12-month post-stroke BP control rate drops down to 52,9 and 51%, respectively. In terms of evolution, only 32,6% of patients had controlled BP in every assessment. One limitation to this work was the loss of follow-up through the 12-month post-stroke period, with just 56% of patients attending both medical appointments.

Conclusion: The percentage of patients with controlled BP was higher than previously reported, but it is still not ideal.

**Alunos** | Students: Andressa Lira Whitehurst

**Projecto** | Project **BCHULN/02**

**Tutores** | Tutors: António Pais de Lacerda, Emília Valadas

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Medicina 2b, HSM/CHULN

**E-mail:** andressa@campus.ul.pt

**Título: Avaliação do Risco Cardiovascular em Homens Infetados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana com Normalização do Rácio CD4/CD8**

Title: Evaluation of Cardiovascular Risk in Men Infected by Human Imunodeficiency Virus with Normalization of CD4/CD8 Ratio

**Palavras-Chave:** VIH, Rácio CD4/CD8, Risco Cardiovascular

**Resumo:**

A eficácia da terapêutica antirretroviral (ART) transformou a infeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) numa doença crónica, alterando o perfil das principais complicações e causas de morte, sendo que as doenças cardiovasculares passaram a ser uma das principais causas de morbi/mortalidade nesta população. Surge, neste sentido, a necessidade de encontrar novos marcadores que facilitem a monitorização e prevenção do risco cardiovascular neste grupo de doentes.

Este estudo pretende avaliar a relação entre o valor do rácio CD4/CD8 e o risco cardiovascular, avaliado através das escalas de risco de Framingham (FRAM) e SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation), e simultaneamente, verificar se este rácio se pode relacionar com alguns marcadores ultrassonográficos de alterações endoteliais indicadores de lesão vascular, como o Índice de Pulsatibilidade (IP) e a Espessura Íntima-média Carotídea (EIMC).

Foram selecionados por amostra de conveniência 79 homens portadores de VIH-1 com idades inferiores a 65 anos, sem história de doenças cardiovasculares, seguidos na consulta de imunodeficiência do Hospital de Santa Maria. Destes, 49 foram submetidos a estudos ultrassonográficos por Eco-Doppler da circulação carotídea e vertebral extracraniana, bem como da circulação intracraniana, com avaliação do Índice de Pulsatibilidade arterial (IP). Dentre outros dados, foram colhidas as contagens de células TCD4+ e TCD8+ dos últimos 5 anos. A análise estatística foi realizada utilizando o Excel e o programa IBM SPSS Statistics 26.

Observou-se a existência de uma correlação inversa significativa entre o IP e o rácio CD4/CD8, sendo esta relação mais intensa para valores do rácio abaixo de 0,4 (impacto no IP de -0,72, $p < 0,01$), atenuando-se à medida que o rácio se aproxima de valores da normalidade (impacto no IP de -0,19, $p < 0,05$), apontando para uma maior disfunção imunitária e risco cardiovascular nos pacientes com rácio mais baixo (< 0,4) apresentando IP mais elevados, e uma diminuição deste risco com a normalização do rácio. Verificou-se ainda que, em média, o rácio CD4/CD8 se mantém constante ao longo do tempo e que existe uma relação significativa entre a contagem de células TCD4+ e o SCORE ($p < 0,05$).

Keywords: HIV, CD4/CD8 Ratio, Cardiovascular Risk

Abstract:

The efficacy of antiretroviral therapy (ART) has turned Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection into a chronic disease, altering the profile of main complications and causes of death, so that cardiovascular diseases became one of the main causes of morbi/mortality in this population. In this regard, there has been an increasing need to find new markers to monitor and predict cardiovascular risk in these patients.

This study aimed to evaluate the relation between CD4/CD8 ratio and cardiovascular risk, measured by Framingham (FRAM) and SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation) risk scores, as well as by echographic markers of endothelial alterations such as the Pulsatibility Index (PI) and Intima-Media Carotid Thickness (IMT).

Seventy-nine men infected with HIV-1, aged < 65 years and with no history of cardiovascular disease were selected by convenience sample in the immunodepression follow-up consultation of Hospital de Santa Maria. Of these, 49 were subject to carotid, vertebral and intracranial Eco-doppler examination. Among other data, TCD4+ and TCD8+ cell counts of the previous 5 years were collected. Statistical analysis was performed using Excel and IBM SPSS Statistics 26.

We found a significant reverse correlation between PI and CD4/CD8 ratio, which was more intense for ratios below 0,4 (impact on PI of -0,72, $p < 0,01$), attenuating as the ratio approached normal values (impact on PI of -0,19, $p < 0,05$), signalling a greater immune dysfunction and cardiovascular risk among infected patients with a lower ratio (< 0,4), and an attenuation of this risk as the ratio normalizes. We also observed that, in average, the CD4/CD8 ratio remains constant over time and that there is a significant relationship between TCD4+ count and SCORE ($p < 0,05$).

**Alunos** | Students: João Filipe Marçal de Sousa

**Tutores** | Tutors: Sandra Martins

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Maria Carmo-Fonseca Lab, iMM-JLA

**E-mail:** joaofsousa@campus.ul.pt



**Título: Estudo do transcriptoma de cardiomiócitos portadores de mutações associadas a Cardiomiopatia Hipertrófica**

Title: Transcriptome analysis of cardiomyocytes that carry mutations associated with Hypertrophic Cardiomyopathy

**Palavras-Chave:** cardiomiopatia hipertrófica; diferenciação cardíaca; qRT-PCR

**Resumo:**

Fundamento: A Cardiomiopatia Hipertrófica (CMH) é a doença cardíaca genética mais comum. Apesar de mais de 1500 mutações terem sido identificadas, em ~50% dos doentes clinicamente diagnosticados com CMH não é possível identificar a causa genética associada à patologia. Como é difícil obter células cardíacas de doentes torna-se necessário gerar modelos celulares da doença, para estudar o impacto e o mecanismo pelo qual variantes em genes sarcoméricos poderão estar na sua base.

Objetivos: Comparar a expressão de genes sarcoméricos entre cardiomiócitos diferenciados a partir de células estaminais pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs) com células do coração humano adulto.

Métodos: Neste estudo fez-se a análise do transcriptoma de cardiomiócitos diferenciados a partir de hiPSCs, no que respeita a vários genes sarcoméricos, *MYBPC3*, *MYH7*, *MYH6*, *ACTN2*, *TNNT2*, *TTN*, *TNNI1* e *TNNI3* e das isoformas fetal e adulta dos transcritos de *TNNT2* e *TTN*, e comparou-se com o transcriptoma de células do coração humano adulto.

Resultados: Verificou-se que a expressão de genes sarcoméricos entre as hiPSCs diferenciadas em cardiomiócitos e as células do coração humano adulto são semelhantes, embora as hiPSCs expressem maioritariamente as isoformas fetais dos genes *TNNT2* e *TTN*.

Conclusões: Deste modo, podemos concluir que os cardiomiócitos obtidos por este protocolo não têm ainda um elevado grau de maturação, o que deverá ser otimizado para utilização deste sistema como modelo celular de CMH.

Key-Words: hypertrophic cardiomyopathy; cardiac differentiation; qRT-PCR

Abstract:

Background: Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM) is the most frequent genetic cardiac disease. Although over 1500 mutations have been identified, in ~50% of patients diagnosed with HCM, it is not possible to identify its genetic cause. Since obtaining cardiomyocytes from patients is difficult, it is necessary to create cellular models of the disease, to study the impact and the mechanism by which variants in sarcomeric genes could cause this pathology.

Objectives: Compare the expression of sarcomeric genes between cardiomyocytes differentiated from pluripotent stem cells (hiPSCs) and cells obtained from the adult human heart.

Methods: In this study, we analyzed the transcriptome of cardiomyocytes differentiated from hiPSCs, regarding several sarcomeric genes, *MYBPC3*, *MYH7*, *MYH6*, *ACTN2*, *TNNT2*, *TTN*, *TNNI1* and *TNNI3* and the fetal and adult isoforms of *TNNT2* and *TTN* transcripts, and we compared it to the transcriptome of adult human heart cells.

Results: We found that the sarcomeric gene expression of cardiomyocytes derived from hiPSCs (hiPSC-CMs) is similar to that of the adult human heart cells, although hiPSC-CMs express mostly the fetal isoforms of the *TNNT2* and *TTN* genes.

Conclusions: Thus, we can conclude that the hiPSC-CMs obtained through this protocol do not yet have a high degree of maturation, which should be optimized for future use of this system as a cellular model of HCM.

**Alunos** | Students: Márcio António Nunes Ramos, Maria Helena Viegas da Cunha

**Tutores** | Tutors: Pedro Miguel Antunes Oliveira, Ivo Piedade Álvares Furtado

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Anatomia

**E-mail:** marcio.a.ramos@campus.ul.pt, mariahcunha@campus.ul.pt, po1@medicina.ulisboa.pt, ivo.furtado@staff.uma.pt

**Projecto** | Project **PEC/14**

**Título: Reabilitação de peças anatómicas e identificação de estruturas para ensino e desenvolvimento de competências anátomo-clínicas por alunos de anatomia**

Title: Rehabilitation of anatomical pieces and identification of structures for teaching and developing anatomoclinical competences by anatomy students

**Palavras-Chave:** anatomia, educação médica, aprendizagem autónoma

**Resumo:**

Fundamento: A anatomia macroscópica é fundamental para a educação médica e o estudo de corpos dissecados, que demonstram a anatomia, as variantes do normal e a doença como o são na realidade, é uma ferramenta científica e pedagógica com valor insubstituível. A presente investigação contempla as seguintes hipóteses: a identificação de estruturas anatómicas em peças cadavéricas é um método pedagógico eficaz na consolidação dos conhecimentos anatómicos, tanto na anatomia normal, como nas alterações que possam ocorrer; e há um ganho simultâneo obtido pela reabilitação do património anatómico existente no Instituto de Anatomia (IA) da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (FMUL), disponibilizado para fins pedagógicos.

Objetivos: reabilitar peças anatómicas existentes no Instituto de Anatomia; orientar o aluno na correta identificação das estruturas; acompanhar e aferir o acréscimo de conhecimento dos alunos; implementar uma pedagogia cirúrgica no grupo de estudantes envolvidos no projeto; obter material anatómico preparado para estudo autónomo dos estudantes de pré e pós-graduação; preparar material adequando para utilização em provas de avaliação do tipo *Objetive Structured Clinical Examination* (OSCE).

Métodos: em primeiro lugar, serão escolhidas dez peças para restaurar, representativas das várias regiões anatómicas, de entre as que já existem no Instituto de Anatomia. De seguida, os espécimes serão limpos e preparados para o estudo anatómico que incluirá a reabilitação destes e a identificação das estruturas anatómicas mais relevantes. De seguida, para cada peça serão propostas as legendas das estruturas pelos alunos e professores. Para avaliação do método sob ponto de vista pedagógico, será aferido o grau de concordância da proposta de legenda na identificação das estruturas anatómicas entre as legendas propostas pelos alunos e as propostas pelos professores.

Resultados e plano de estudos futuros para concluir o projeto: atualmente já foram completamente restaurados três espécimes, incluindo um contendo uma rara variante anatómica muscular, o músculo condroepitroclear. Uma quarta peça já se encontra em fase de conclusão e encontramo-nos a selecionar os restantes seis espécimes que iremos intervencionar.

Conclusões: nesta fase do projeto já temos algum material passível de ser utilizado nas aulas e avaliações de anatomia, mas precisamos de completar mais peças anatómicas a fim de aferir as competências adquiridas pelos alunos envolvidos.

Key-Words: anatomy, medical education, self-directed learning as topic

Abstract:

Background: Macroscopic anatomy is paramount to medical education, and the study of dissected bodies, which demonstrate anatomy and its normal and pathological variants as they are in reality, is a scientifical and pedagogical tool of inestimable value. The present study contemplates the following working hypothesis: the identification of anatomical structures in cadaver specimens is an effective pedagogical method to consolidate anatomical knowledge, both in regular anatomy as well as in its variations; and there is a simultaneous gain obtained by the rehabilitation of the anatomical patrimony existent in the Institute of Anatomy of the Faculty of Medicine of the University of Lisbon, made available for pedagogical purposes.

Objectives: to rehabilitate anatomical specimens from the Institute of Anatomy; to guide the students towards the correct identification of structures; to follow up and evaluate the increased students skills; to implement a surgical pedagogy in the group of students involved in the project; to obtain anatomical material for self-directed learning by the pre and post graduate students; to prepare adequate materials for utilization in practical examinations such as Objective Structured Clinical Examinations (OSCE).

Methods: first, ten anatomical pieces among those present in the Institute of Anatomy, representative of the various body regions, will be chosen for restauration. Then, the specimens will be cleaned and prepared for the anatomical study, which will include their rehabilitation and the identification of the most pertinent anatomical structures. Afterwards, the students and teachers will propose captions for the identified structures. To evaluate this method under a pedagogical viewpoint, the captions produced by the different elements of the team will be compared.

Results and plan of the future studies required to execute the project: we have concluded the restauration of three pieces, including one containing a rare variant muscle, the chondroepitrochlearis muscle. A fourth piece is under restauration at the moment, and we are also selecting the remaining six pieces we are going to intervene.

Conclusions: at this phase of the project we already produced proper material for being utilized in anatomy classes and evaluations, but we still need to finish more specimens in order to assess the skills obtained by the students.

**Alunos** | Students: Mafalda Carneiro

**Tutores** | Tutors: Alexandre Rainha Campos, Lia Lucas Neto

**Laboratório, Centro, Unidade |** Laboratory, Centre, Unit: Clínica Universitária de Neurocirurgia, Instituto de Anatomia

**E-mail:** mafaldasofiacarneiro@campus.ul.pt



**Título: Cirurgia Endoscópica Transesfenoidal - A impressão 3D na formação de neurocirurgiões**

Title: Endoscopic Transsphenoidal Surgery - 3D Printing in Neurosurgeons Formation

**Palavras-Chave:** Endoscopia; Neurocirurgia; Tecnologia de impressão 3D

**Resumo:**

Fundamento: A cirurgia endoscópica endonasal transesfenoidal (CEET) é uma técnica cirúrgica de abordagem da base do crânio. Apesar de a prática ser condição necessária para se atingir o grau de *expertise* em CEET, atualmente os recursos de treino são limitados. Neste estudo foram desenvolvidos modelos multimateriais de impressão 3D para treino de CEET.

Objetivos: Este estudo tem como propósito avaliar o impacto de modelos multimateriais obtidos por tecnologia de impressão 3D na aprendizagem da anatomia da base do crânio e no treino da CEET.

Métodos: Imagens de tomografia computorizada em formato DICOM de aquisição volumétrica axial contígua foram obtidas de um doente com um macroadenoma da hipófise. Segmentou-se em software *3D Slicer,* a estrutura óssea craniana e os tecidos moles do nariz e das fossas nasais. Para simular a consistência real das várias estruturas anatómicas, os modelos obtidos foram desenvolvidos com diferentes materiais: as partes ósseas com Z-ULTRAT e resina; as partes moles com silicone. Os modelos foram validados por uma equipa multidisciplinar e aplicados num curso dirigido a nove internos de neurocirurgia. No curso, cada participante realizou duas abordagens práticas dos modelos. O impacto destes modelos na aprendizagem da anatomia da base do crânio e no treino cirúrgico foi avaliado por todos os participantes, com recurso a questionários baseados numa escala Likert de 10 pontos. Os referidos questionários avaliaram também a experiência prévia em CEET.

Resultados: Todos os participantes assistiram previamente a pelo menos uma CEET, apesar de apenas um dos participantes ter realizado este tipo de cirurgia como primeiro cirurgião. Seis dos nove internos não tem disponível um método de treino de CEET no seu hospital. Os modelos de treino desenvolvidos neste estudo foram validados como tendo um elevado grau de realismo anatómico. O impacto destes modelos na aprendizagem da anatomia da base do crânio e no treino cirúrgico obteve uma pontuação média de 9 pontos.

Conclusões: Os modelos obtidos por tecnologia de impressão 3D são um método prático, económico e fidedigno. Esta tecnologia tem um impacto benéfico na aquisição de competências que permitam melhorar o desempenho de CEET.

Key-Words: Endoscopy; Neurosurgery; 3D printing

Abstract:

Background: Endoscopic endonasal transsphenoidal surgery (EETS) is a surgical technique to approach the skull base. The practice is a necessary condition to reach the expertise degree in EETS, but currently the training resources are limited. In this study, multimaterial 3D printing models were developed for EETS training.

Objectives: This study aims to evaluate the impact of multimaterial models obtained by 3D printing technology on learning the anatomy of the skull base and in EETS training.

Methods: Computed tomography images in DICOM format with contiguous axial volumetric acquisition were obtained from a patient with a pituitary macroadenoma. The cranial bone structure and the soft tissues of the nose and nasal cavities were segmented in the 3D Slicer software. To simulate the real consistency of the various anatomical structures, the models were developed with different materials: the bone parts with Z-ULTRAT and resin; the soft parts with silicone. The models were validated by a multidisciplinary team and applied in a course aimed at nine neurosurgery interns. In the course, each participant took two practical approaches to the models. The impact of these models on learning the anatomy of the skull base and surgical training was assessed by all participants, using questionnaires based on a 10-point Likert scale. These questionnaires also assessed the participants previous experience in EETS.

Results: All participants had previously seen a EETS at least once, although only one of the participants had performed this type of surgery as the first surgeon. Six of the nine participants do not have a EETS training method available in their hospitals. The training models developed in this study were validated as having a high degree of anatomical realism. The impact of these models on learning the anatomy of the skull base and on surgical training obtained an average score of 9 points.

Conclusions: The models obtained by 3D printing technology are a practical, economical and reliable method. This technology has a beneficial impact on the acquisition of skills that will improve EETS performance.

**Alunos** | Students: Rita Afonso Leandro

**Tutores** | Tutors: Carlos Marques-Neves

**Laboratório, Centro, Unidade |** Laboratory, Centre, Unit: Clínica Universitária de Oftalmologia

**E-mail:** rita.leandro@campus.ul.pt



**Título: Variação da pressão intraocular durante a cirurgia de catarata: um estudo prospetivo**

Title: Intraocular pressure behaviour in cataract surgery followed by pars plana vitrectomy: a pilot sudy

**Palavras-Chave:** cirurgia da catarata; pressão intraocular; vitrectomia pars plana

**Resumo:**

A pressão intraocular (PIO) é a pressão produzida pelos fluidos dentro do olho, sendo um importante parâmetro fisiológico na avaliação da condição ocular. Os valores da PIO são determinados principalmente pela produção e drenagem do humor aquoso pelo corpo ciliar e a sua drenagem ocorre pelas redes trabecular e uveoescleral. Atualmente, a facoemulsificação é o procedimento cirúrgico oftálmico mais realizado. Durante a cirurgia da catarata, reconhece-se que a pressão intraocular varia durante as várias etapas, como hidrodissecção, fragmentação nuclear, etapas de irrigação, aspiração (na sucção) e na inserção da lente intraocular. Até à presente data, há uma relativa escassez de estudos clínicos e de literatura em relação ao comportamento da PIO na cirurgia de catarata por facoemulsificação seguida de vitrectomia pars plan.

Objetivo primário: analisar a variação da pressão intraocular durante a cirurgia de catarata em doentes que posteriormente serão submetidos a cirurgia a vitrectomia por via pars plana. Objetivos secundários: Avaliar os efeitos adversos decorrentes de variações bruscas de pressão intraocular, caso existam; Comparar com a variação da pressão intraocular determinada pela altura da garrafa do aparelho de facoemulsificação; Compreender quais as das etapas de cirugia de catarata que induzem maior variação da pressão intraocular; Analisar qual a técnica de facoemulsificação que induz mais variação da pressão intraocular.

Amostra do estudo: doentes adultos (idade superior ou igual a 18 anos) com indicação para facoemulsificação com colocação de lente intraocular e vitretomia por via pars plana, em seguimento no serviço de Oftalmologia do Centro Hospitalar Lisboa Norte. Número mínimo pretendido da amostra: 50 doentes.

Desenho do estudo: prospectivo e observacional

Métodos: Exame oftalmológico à admissão, pré-operatório, pós-cirúrgico imediato e ao D1, D7, D30: (melhor acuidade visual corrigida em D30), pressão intraocular, sinais inflamatórios nos pontos de sutura, transparência da córnea, reação celular na câmara anterior, regularidade da pupila, lente intraocular, alterações no vítreo/retina.

Métodos de colheita de dados: Os dados clínicos serão recolhidos pelos investigadores do Departamento de Oftalmologia e a análise de dados da pressão intraocular obtidas pelo transdutor elétrico é efetuada pelos investigadores do Departamento de Fisiologia.

Espera-se que grandes variações da pressão intraocular e por períodos prolongados no tempo ao longo da intervenção cirúrgica, levam consequentemente a efeitos adversos sequelares como lesões do endotélio da córnea (inflamação e edema da córnea) e alterações do fluxo vascular (nervo óptico, retina e coróide).

Key-Words: cataract surgery; intraocular pressure, pars plan vitrectomy

Abstract:

Intraocular pressure (IOP) is the pressure produced by fluids within the eye, being an important physiological parameter in the assessment of eye condition. IOP values are determined mainly by the production and drainage of aqueous humor by the ciliary body and its drainage occurs through the trabecular and uveoscleral networks. Currently, phacoemulsification is the most commonly performed ophthalmic surgical procedure. During cataract surgery, it is recognized that intraocular pressure varies during the various stages, such as hydrodissection, nuclear fragmentation, stages of irrigation, aspiration (in suction) and insertion of the intraocular lens. To date, there is a relative scarcity of clinical studies and literature regarding the behavior of IOP in cataract surgery by phacoemulsification followed by pars plan vitrectomy.

Primary objective: to analyze the variation of intraocular pressure during cataract surgery in patients who will subsequently undergo surgery for vitrectomy via pars plano. Secondary objectives: Assess the adverse effects resulting from sudden variations in intraocular pressure, if any; Compare with the variation in intraocular pressure determined by the height of the bottle of the phacoemulsification device; Understand which of the stages of cataract surgery that induce greater variation in intraocular pressure; Analyze which phacoemulsification technique induces more variation in intraocular pressure.

Study sample: adult patients (aged 18 years or over) with indication for phacoemulsification with placement of intraocular lens and vitretomy via pars plano, in follow-up at the Ophthalmology Service of Centro Hospitalar Lisboa Norte. Minimum number sample size: 50 patients.

Study design: prospective and observational

Methods: Ophthalmological examination at admission, preoperative, immediate post-surgical and at D1, D7, D30: (best visual acuity corrected at D30), intraocular pressure, inflammatory signs at the suture points, corneal transparency, cell reaction in the chamber anterior, pupil regularity, intraocular lens, vitreous / retina changes.

Methods of data collection: Clinical data will be collected by researchers from the Department of Ophthalmology and the analysis of intraocular pressure data obtained by the electric transducer is performed by researchers from the Department of Physiology.

It is expected that large variations in intraocular pressure and for prolonged periods of time throughout the surgical intervention, consequently lead to adverse sequelae effects such as corneal endothelial lesions (corneal inflammation and edema) and changes in vascular flow (optic nerve, retina and choroid).

**Alunos** | Students: Maria Madalena Sobral Cordeiro Pupo Correia

**Tutores** | Tutors: Patrício Terra Aguiar

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Clínica Universitária de Medicina I

**E-mail:** mariamadalenacorreia@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC/28**

**Título: Estudo do Prognóstico da Sobrevivência Renal no Doente Médico com Lesão Renal Aguda durante o Internamento**

Title: Study of Renal Survivor in Medical Patients with Acute Kidney Injury during Hospitalization

**Palavras-Chave:** Lesão Renal Aguda, Prognóstico, Recuperação Renal

**Resumo:**

A lesão renal aguda (LRA) é considerada uma das complicações mais graves em indivíduos hospitalizados, com incidência na população internada estimada em 18,3%. Este estudo pretende analisar o impacto de diversos fatores clínicos e laboratoriais no prognóstico destes episódios a nível da função renal.

Realizou-se um estudo cohort retrospetivo no Hospital de Santa Maria, com 152 doentes. LRA foi definida de acordo com os critérios *Kidney Disease; Improving Global Outcomes* (KDIGO) e definiu-se sobrevivência renal de acordo com a recomendações de 2019 da UK Renal Association. O outcome primário foi a sobrevivência renal à data da alta e os secundários a sobrevivência renal 2 a 4 meses depois, mortalidade a 28 dias e necessidade de diálise *de novo*.

A pandemia se SARS-CoV-2 impediu o acesso aos edifícios do Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, pelo que os dados recolhidos não são suficientes para alcançar a amostra mínima calculada. Planeia-se expandir a amostra para o valor previamente calculado, realizando-se, posteriormente, a análise estatística de inferência e a construção de um modelo preditivo do prognóstico com recurso à ferramenta WEKA, para mineração de dados. Não obstante, será apresentada a estatística descritiva da amostra já incluída e discutidas as reflexões sobre a mesma.

Key-Words: Acute Kidney Injury, Prognosis, Kidney Recovery

Abstract:

Acute kidney injury (AKI) is considered one of the most serious complications in hospitalized patients, with an incidence in the hospitalized individuals estimated at 18.3%. This study aims to analyze the impact of several clinical and laboratory data in the prognosis regarding kidney function.

This was a retrospective cohort study carried at Hospital de Santa Maria, with 152 patients. AKI was defined according to *Kidney Disease; Improving Global Outcomes* (KDIGO) criteria and Kidney Recovery according to 2019 Guideline of the UK Renal Association. The primary outcome was kidney recovery at the time of discharge and the secondary outcomes were kidney recover 2 to 4 months later, 28-day mortality and new need for dialysis.

SARS-CoV-2 pandemic prevented access to the buildings of the Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, so the number of patients included did not reach the minimum calculated sample. It's further planned to expand the sample to the estimated value, subsequently carrying out a statistical analysis of inference and building a predictive prognostic model using the WEKA tool for data mining. Nonetheless, the descriptive statistics will be presented, as well as the concerning discussion.

# Sessão de Posters II

PAINEL

Karine Serre | Sandra Casimiro | Sérgio Dias | Teresa Pacheco | Vanessa Morais

**Alunos** | Students: Maria Luísa Mendes Godinho Figueiredo de Alvarenga

**Tutores** | Tutors: Sérgio de Almeida

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Sérgio de Almeida Lab, iMM-JLA

**E-mail:** malvarenga@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC/05**

**Título: A inibição das enzimas supressoras de R-loops como um novo tratamento no cancro da mama**

Title: Inhibition of R-loop suppressor enzymes as a new breast cancer treatment

**Palavras-Chave:** Cancro de mama, dano genómico, apoptose induzida

**Resumo:**

Grande parte dos cancros de mama dependem de estrogénio para crescer. No entanto, a ativação, por parte do estrogénio, da transcrição de genes que promovem o crescimento do tumor leva à formação de R-loops (ácidos nucleicos compostos pela hibridização de DNA com RNA) que, apesar das suas diversas funções fisiológicas, são uma fonte de dano celular. Como forma de evitar a acumulação de dano celular e consequente apoptose, as células de cancro de mama hormono-dependentes parecem utilizar amplamente um conjunto de enzimas que suprimem os R-loops. Esta evidência torna os inibidores de enzimas supressoras de R-loops uma arma a investigar como terapêutica alternativa, seletiva, no cancro de mama hormono-dependente, resistente a hormonoterapia.

De forma a estudar o potencial da inibição das enzimas supressoras de R-loops na indução da morte seletiva das células de cancro hormono-dependentes, por intermédio da acumulação excessiva de danos, procedeu-se à transfecção de RNA de interferência das enzimas THOC1, DDX23 e SRPK2 nas células em cultura. De modo a verificar se haveria evidência de mais dano celular e sinalização para apoptose, após inibição das enzimas, avaliou-se a expressão de proteínas como p21 e γH2AX, por western blot. Neste estudo, é fundamental o aparecimento de diferenças significativas entre células transfectadas com RNA de interferência das enzimas supressoras de R-loops, e células transfectadas com RNA de interferência que não tem correspondência nas células humanas (grupos controlo). Até à data utilizadas MDA-MB-231 (células cancro de mama triplo negativo), MCF7 e ZR-75-1 (células de cancro de mama dependentes de estrogénio).

A experimentação deste projeto está em curso, sendo necessária a obtenção de mais resultados, e uma validação destes através da utilização de outros métodos, para que a hipótese seja corroborada.

Key-Words: Breast cancer, genomic damage, induced apoptosis

Abstract:

The growth of most breast cancers is estrogen-dependent. However, the genes transcription activation by estrogen that promote tumour growth leads to the formation of R-loops (nucleic acids composed by the hybridization of DNA with RNA) that, despite their diverse physiological functions, are a source of cell damage. As a way of preventing the accumulation of cellular damage and consequent apoptosis, hormone dependent breast cancer cells appear to use a set of enzymes that suppress R-loops. This evidence makes the inhibition of this suppressive enzymes a weapon to be investigated as an alternative selective therapy, to be used in hormone-dependent breast cancer that is already resistant to hormone therapy.

In order to study the potential of inhibition of this R-loops suppressive enzymes in inducing the selective death of hormone-dependent cancer cells, by the excessive accumulation of damage, we proceeded with the transfection of interference RNA from the enzymes THOC1, DDX23 and SRPK2 in cultured cells. In order to verify if there is evidence of more cell damage and signalling for apoptosis, after inhibiting the enzymes, the expression of proteins such as p21 and γH2AX was evaluated by western blot. In this study, it is essential to have differences between cells transfected with interference RNA of R-loops suppressive enzymes, and cells transfected with interference RNA that does not match human cells (control groups). To date MDA-MB-231 (triple negative breast cancer cells), MCF7 and ZR-75-1 (estrogen-dependent breast cancer cells) have been used.

The experimentation of this project is in progress, and it is necessary to obtain more results, and their validation using other methods, to validate the initial hypothesis.

**Alunos** | Students: Catarina Fernandes Pereira Noronha Ribeiro

**Tutores** | Tutors: Célia Da Conceição Vicente Carvalho

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Maria Carmo-Fonseca Lab, iMM-JLA

**E-mail:** ribeiro.catarina1@campus.ul.pt



**Título: Qual o mecanismo pelo qual o lncRNA PCAT-1 afeta o BRCA2?**

Title: What is the mechanism by which lncRNA PCAT-1 affects BRCA2?

**Palavras-Chave:** PCAT-1; BRCA2; Regulação Génica

**Resumo:**

O cancro da próstata é um dos mais comuns e uma das principais causas de mortalidade, por cancro, nos homens. Os lncRNAs são possíveis biomarcadores usados de forma a distinguir os diferentes tipos de cancro e a gravidade de cada um destes. Alterações na expressão de lncRNAs estão implicadas nos diferentes tipos de cancro sendo que estes podem ser considerados como oncogenes ou genes supressores.

O lncRNA PCAT-1 funciona predominantemente como um repressor transcricional regulando negativamente a expressão do gene BRCA2 e positivamente a expressão da oncoproteína Myc. O PCAT-1 demonstrou um significativo efeito inibitório sobre a atividade da reparação por recombinação homóloga (HR) mediando a repressão pós-transcricional do BRCA2 reduzindo a estabilidade do mRNA do BRCA2 e foi sugerido que pode funcionar como um novo mecanismo de "BRCAness" em cancros esporádicos. Ao mesmo tempo, a expressão do PCAT-1 confere uma sensibilidade ao "genotoxic stress" diminuindo a resposta da HR, levando à acumulação das DSBs. No entanto, o modo como o PCAT-1 está implicado na regulação do gene BRCA2 ainda não é conhecido.

O objetivo deste projeto é investigar o mecanismo pelo qual o PCAT-1 afeta a expressão de BRCA2. Como este lncRNA está desregulado em células de cancro da próstata e afeta a expressão de BRCA2, e sabendo os mecanismos já conhecidos pelos quais lncRNAs regulam expressão génica, surgem 3 hipóteses: PCAT-1 regula a transcrição do gene BRCA2, o processamento do pré-mRNA de BRCA2 ou a estabilidade do mRNA BRCA2.

Será utilizada a linha celular derivada de cancro da próstata LNCaP. As experiências serão todas realizadas em paralelo em células controlo (RNAi "mock") e em células onde o nível de lncRNA PCAT-1 foi reduzido por RNAi. A eficácia do RNAi será avaliada por RT-qPCR com "primers" específicos. Para estudar a regulação do PCAT-1 sobre a transcrição do gene BRCA2 procede-se à quantificação de pré-mRNA BRCA2 utilizando a técnica de RT-qPCR. Para analisar apenas o pré-mRNA recém sintetizado, fazemos uma marcação metabólica pelo método 4-tio-uridina(4SU) com um pulso de poucos minutos. De maneira a avaliar a hipótese do PCAT-1 regular o processamento do pré-mRNA é necessário avaliar as isoformas de mRNA BRCA2 sequenciando-se o cDNA BRCA2 após amplificação por PCR. A estabilidade do mRNA BRCA2 é avaliada pelo tempo de semi-vida. Para tal faz-se uma marcação metabólica pelo método 4SU com um pulso de poucos minutos seguido de períodos de "caça" de várias horas. A quantidade de mRNA BRCA2 presente após os vários períodos de caça é determinada por RT-qPCR.

O estudo permitirá caracterizar mais especificamente a regulação da expressão do BRCA2 pelo lncRNA PCAT-1. Assim, pretende contribuir para uma melhor caracterização do PCAT-1, se poderá ser considerado um gene associado ao fenótipo de BRCAness e, eventualmente, ser um marcador de suscetibilidade a tratamentos preferencialmente administrados a doentes com tumores mutados em BRCA1 e BRCA2.

Key-Words: PCAT-1, BRCA2, Gene Regulation

Abstract:

Prostate cancer is one of the most common and a major cause of cancer mortality in men. LncRNAs are possible biomarkers used in order to distinguish the different types of cancer and the severity of each of them. Changes in the expression of lncRNAs are implicated in different types of cancer, which can be considered as oncogenes or suppressor genes.

The PCAT-1 lncRNA functions predominantly as a transcriptional repressor by negatively regulating the expression of the BRCA2 gene and positively regulating the expression of the Myc oncoprotein. PCAT-1 demonstrated a significant inhibitory effect on the repair activity by homologous recombination (HR) mediating post-transcriptional repression of BRCA2 reducing the stability of BRCA2 mRNA and it has been suggested that it may function as a new mechanism of "BRCAness" in sporadic cancers. At the same time, the expression of PCAT-1 confers a sensitivity to "genotoxic stress", decreasing the HR response, leading to the accumulation of DSBs. However, the way PCAT-1 is involved in the regulation of the BRCA2 gene is not yet known.

The purpose of this project is to investigate the mechanism by which PCAT-1 affects the expression of BRCA2. As this lncRNA is dysregulated in prostate cancer cells and affects the expression of BRCA2, and taking into account the already known mechanisms by which lncRNAs regulate gene expression, 3 hypotheses arise: PCAT-1 regulates the transcription of the BRCA2 gene, the processing of pre-mRNA of BRCA2 or the stability of the BRCA2 mRNA.

In this study, we will use the LNCaP prostate cancer derived cell line. The experiences will all be carried out in parallel in control cells (mock RNAi) and in cells where the level of PCAT-1 lncRNA was reduced by RNAi. The effectiveness of RNAi will be assessed by RT-qPCR with specific primers. To study the regulation of PCAT-1 on the BRCA2 gene transcription, the BRCA2 pre-mRNA quantification is performed using the RT-qPCR technique. To analyze only the newly synthesized pre-mRNA, we make a metabolic mark using the 4-thio-uridine method (4SU) with a pulse of a few minutes. In order to evaluate the hypothesis of PCAT-1 regulating pre-mRNA processing, it is necessary to evaluate the BRCA2 mRNA isoforms by sequencing the BRCA2 cDNA after PCR amplification. The stability of the BRCA2 mRNA is assessed by the half-life time. To do this, a metabolic mark is made using the 4SU method with a pulse of a few minutes followed by periods of "hunting" of several hours. The amount of BRCA2 mRNA present after the various hunting periods is determined by RT-qPCR.

The study will allow to characterize more specifically the regulation of the expression of BRCA2 by the lncRNA PCAT-1. Thus, it intends to contribute to a better characterization of PCAT-1, if it can be considered a gene associated with the BRCAness phenotype and, eventually, be a marker of susceptibility to treatments preferably administered to patients with tumors mutated in BRCA1 and BRCA2.

**Alunos** | Students: Laura Teixeria Castro

**Tutores** | Tutors: Sandra Casimiro

**Laboratório, Centro, Unidade |** Laboratory, Centre, Unit: LCosta Lab, iMM-JLA

**E-mail:** lauracastro@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC/19**

# Título: Efeitos do secretoma de células de cancro da mama RANK+ na diferenciação monocítica

Title: Effect of RANK+ breast cancer cells' secretome in monocytic differentiation

**Palavras-Chave:** TAMs (Tumor Associated Macrophages); osteoclastogénese; via de sinalização RANKL-RANK

## Resumo:

Fundamento: O ativador do recetor do fator nuclear-κB (RANK) é um membro da superfamília do recetor do fator de necrose tumoral (TNFR), ativado após ligação do RANK ligando (RANKL), e promovendo a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. Embora a via RANKL - RANK seja sobretudo conhecida pelo seu papel como reguladora-chave da remodelação óssea e da fisiopatologia das metástases ósseas, também surgiu como um mediador importante da carcinogénese mamária induzida pela progesterona. O RANKL é expresso em células epiteliais mamárias positivas para recetores hormonais (RH).

Demonstrámos recentemente que a sobre-expressão de RANK em células de cancro da mama RE+ HER2- induz características estaminais e de transformação e um fenótipo estaminal e mesenquimal. Os nossos dados preliminares sugerem que meios condicionados (MC) de células de cancro da mama ER+HER2- com sobre-expressão de RANK são capazes de induzir a diferenciação de monócitos *in vitro*. Isto é particularmente importante, uma vez que RANKL demonstrou ser um quimiotractor de monócitos e macrófagos que exprimem RANKL. Além disso, sabe-se que os macrófagos associados ao tumor (TAMs) podem inibir ou estimular o crescimento tumoral, se M1 ou M2 TAMs, respectivamente. Este projeto surge destas descobertas e visa identificar quais as células derivadas de monócitos que são diferenciadas na presença de fatores secretados por células com sobre-expressão de RANK.

Objetivos: Os objetivos deste projeto são (1) identificar as células diferenciadas a partir da linhagem monocítica após exposição ao secretoma de células RANK+ (osteoclastos e/ou macrófagos M1/M2) e (2) caracterizar o secretoma de células RANK+.

Métodos: Um painel de linhas celulares de cancro da mama (MDA-MB-231, MCF-7, T47D e BT474), e os seus clones derivados com sobre-expressão de RANK (RANK OE), foi colocado em cultura em condições padrão, e os MC foram recolhidos a 80% de confluência celular, centrifugados durante 5 minutos a 1000 g, aliquotados, e armazenados a -80°C. As células monocíticas (linha celular de murganho RAW264.7) foram postas em cultura durante 5 dias sob condições de diferenciação ± 25% MC, e a osteoclastogénese foi quantificada pela marcação e ELISA da TRAcP5b. A presença de macrófagos M1/M2 foi avaliada por citometria de fluxo (marcadores de linhagem: Marcadores Ly6C, F4/80 e CD11b; marcadores M1: iNOS, IL-1b, ICAM-1 e MHC-II; marcadores M2: CD206, PD-L2 e PD-L1; e Aqua Zombie para segregar células vivas e mortas).

Resultados: Como observado pela marcação TRAcP 5b, nenhum dos MC foi capaz de induzir osteoclastogénese na ausência de RANKL exógeno; e em todos os casos, o MC diminuiu a osteoclastogénese na condição RANKL-CM em comparação com o RANKL sozinho. A contagem dos osteoclastos após coloração TRAcP 5b e quantificação TRAcP5b por ELISA no sobrenadante de cultura mostra que este efeito foi reduzido na condição RANK OE MDA-MB-231 em comparação com as células parentais; mas aumentado em linhas de células luminais RANK OE em comparação com as células parentais. No entanto, observaram-se células morfologicamente diferenciadas, sem características de osteoclastos.

Conclusões: Estes resultados sugerem que a presença de CM pode afetar a osteoclastogénese ou promover a diferenciação de outras células, tais como macrófagos M1/M2. A caracterização de células diferenciadas por citometria de fluxo permitir-nos-á confirmar a presença de macrófagos. Neste caso, a CM será ainda caracterizada por perfil de citocinas multiplex, a fim de identificar os fatores putativos que afetam a diferenciação dos monócitos.

Key-Words: TAMs (Tumor Associated Macrophages); osteoclastogenesis; RANKL-RANK pathway

## Abstract:

Background: The receptor activator of nuclear factor-κB (RANK) is a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily, which is activated upon RANK ligand (RANKL) binding, promoting cell proliferation, survival and differentiation. Although RANKL - RANK pathway is mostly known for its role as a key regulator of bone remodeling and pathophysiology of bone metastases, it also emerged as a major mediator of hormone-driven breast carcinogenesis. RANKL expressed by hormone receptor (HR)-positive mammary epithelial cells (MECs) drives the proliferation of HR-negative RANK-expressing mammary stem cells (MaSCs).

We recently demonstrated that ER+ HER2- RANK OE breast cancer cells exhibit stemness and transformation features, and a staminal and mesenchymal phenotype, .

Additionally, our preliminary data suggests that conditioned media (CM) from RANK OE ER+HER2- breast cancer cells was able to induce the differentiation of monocytes *in vitro*. This is particularly important, since RANKL has shown to be a chemoattractant to RANK-expressing monocytes and macrophages. Moreover, is known that tumor-associated macrophages (TAMs) can inhibit or stimulate tumor growth, if M1 or M2 TAMs, respectively. This project stems from these findings and aims to identify monocyte-derived cells in the presence of RANK-driven ER+HER2- breast cancer cells secretome.

Objectives: The objectives of this project are (1) to identify the cells differentiated from the monocytic lineage upon exposure to the secretome of RANK OE cells, by assessing the presence of osteoclasts and/or M1/M2 macrophages; and (2) to characterize the secretome of RANK-overexpressing cells.

Methods: A panel of breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MCF-7, T47D and BT474), and their derived RANK OE clones, was cultured under standard conditions, and CM were collected at 80% cellular confluence, centrifuged for 5 minutes at 1000g, aliquoted, and stored at -80°C. Monocytic cells (murine RAW264.7 cell line) were cultured for 5 days under differentiation conditions ± 25% CM, and osteoclastogenesis was quantified by TRAcP5b staining and ELISA. Presence of M1/M2 macrophages will be assessed by flow cytometry (Lineage markers: Ly6C, F4/80 and CD11b; M1 markers: iNOS, IL-1b, ICAM-1 and MHC-II; M2 markers: CD206, PD-L2 and PD-L1; and Aqua Zombie to segregate live and dead cells).

Results: As observed by TRAcP 5b staining, none of the CM was able to induce osteoclastogenesis in the absence of exogenous RANKL; and in all cases, CM decreased osteoclastogenesis in RANKL-CM condition in comparison with RANKL alone. Osteoclast counting after TRAcP 5b staining and TRAcP5b quantification by ELISA in the culture supernatant shows that this effect was reduced in RANK OE MDA-MB-231 in comparison with parental cells; but increased in RANK OE Luminal cell lines in comparison with parental. Morphologically differentiated cells, but not osteoclasts, were observed in the presence of CM.

Conclusions: So far, our results suggest the CM may impair osteoclastogenesis and/or alternatively promote the differentiation of other cells, such as M1/M2 macrophages. Characterization of differentiated cells by flow cytometry will allow us to confirm the presence of macrophages. In this case, the CM will be further characterized by multiplex cytokine profiling, in order to identify putative factors affecting monocyte differentiation.

**Alunos** | Students: Beatriz Lima

**Tutores** | Tutors: Célia Carvalho

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Maria Carmo-Fonseca Lab, iMM-JLA

**E-mail:** beatrizlima1@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC/21**

**Título: Modulação de splicing em doentes portadores de mutação no gene BRCA2: potencial terapêutico**

Title: Splicing modulation in patients carrying a mutation in the BRCA2 gene: therapeutic potential.

**Palavras-Chave:** Cancro mama hereditário; BRCA2; splicing

**Resumo:**

Fundamento: A proteína BRCA2 é essencial para o processo de reparação do DNA por recombinação homóloga (HRR). Aproximadamente 2 a 15% das doentes com cancro hereditário da mama ou do ovário são portadoras de variantes nos genes BRCA1 e BRCA2. Em muitos casos, são identificadas variantes de significado desconhecido (VUS: variants of unknown significance). A clarificação do potencial significado funcional das variantes classificadas como VUS é imperativa para o acompanhamento clínico e preventivo das doentes e seus familiares.

Objetivo: Avaliar o impacto funcional de uma mutação germinal em homozigotia no intrão 8 (BRCA2: c.681 +5G>C), classificada como VUS.

Métodos: Foram estudadas duas irmãs portadoras da mutação. Foram geradas duas linhas celulares linfoblastóides derivadas das células mononucleares do sangue periférico. Utilizou-se a tecnologia Droplet Digital RT-PCR para quantificar os níveis de expressão do gene BRCA2 bem como as diferentes isoformas resultantes de splicing dos seus transcritos. Para o estudo funcional do mecanismo de HRR as células em cultura foram tratadas com Etoposido, 15 min e deixadas recuperar durante 24h. A quantidade de lesões foi avaliada por imunodeteção da histona gamma-H2AX, 30 min e 24h após o tratamento. O recrutamento de RAD-51 para os locais de reparação foi avaliado por imunodeteção 6h após o tratamento. Os resultados foram analisados por microscopia de fluorescência confocal. A indução de modificações no genoma das células foi feita através da transfeção (por eletroporação) de complexos de CRISPR-Cas9 com crRNA desenhados por nós e dirigidos contra regiões que flanqueiam o exão 7 do gene BRCA2.

Resultados: A avaliação dos mRNA BRCA2 mostrou a presença de várias isoformas de splicing expressas em diversas quantidades relativas. Os nossos resultados indicam também que a isoforma mais abundante (~66%) é alvo de degradação pelo mecanismo de NMD (Nonsense Mediated Decay). A análise por Western blot mostrou a presença da proteína BRCA2 (400kDa) nas células das doentes com o tamanho equivalente ao das células controlo, mas em menor quantidade. Os estudos funcionais apontam para uma redução significativa da formação de focos de RAD51, uma marca de defeitos na função da BRCA2. Com o objetivo de aumentar os níveis de proteína BRCA2 expressa nas células mutadas, procedemos à modificação do genoma mediada por CRISPR-Cas9 de forma a modular o padrão de splicing e retomar o quadro de leitura, evitando assim a degradação do mRNA por NMD.

Conclusões: Os ensaios celulares e moleculares realizados revelam que a mutação provoca a degradação do mRNA mutado e diminuição da expressão de proteína BRCA2, o que interfere com a função de HRR. Através de edição genética, conseguimos modular o padrão de splicing e aumentar a expressão de uma isoforma de mRNA estável. Estão em curso experiências para determinar a funcionalidade da proteína BRCA2 traduzida a partir destas isoforma de mRNA. Os nosso estudo poderá abrir caminhos para a correção de defeitos genómicos por modulação de splicing em síndrome do cancro da mama hereditário.

Key-Words: Hereditary breast cancer; BRCA2; splicing

Abstract:

Background: The BRCA2 protein is essential for the DNA repair process by homologous recombination (HRR). Approximately 2 to 15% of patients with hereditary breast or ovarian cancer carry variants in the BRCA1 and BRCA2 genes. In many cases, variants of unknown significance (VUS: variants of unknown significance) are identified. The clarification of the potential functional significance of variants classified as VUS is imperative for the clinical and preventive monitoring of patients and their families.

Objectives: To evaluate the functional impact of a homozygous germline mutation in intron 8 (BRCA2: c.681 + 5G> C), classified as VUS.

Methods: Two sisters carrying the mutation were studied. Two lymphoblast cell lines were generated from peripheral blood mononuclear cells. Droplet Digital RT-PCR technology was used to quantify the expression levels of the BRCA2 gene as well as the different isoforms resulting from the splicing of its transcripts. For the functional study of the HRR mechanism, cells in culture were treated with Etoposide for 15 min and allowed to recover for 24 hours. The number of lesions was assessed by immunodetection of histone gamma-H2AX, 30min and 24h after treatment. Recruitment of RAD-51 to the repair sites was assessed by immunodetection 6 hours after treatment. The results were analyzed by confocal fluorescence microscopy. The induction of modifications in the cell genome was done through the transfection (by electroporation) of CRISPR-Cas9 complexes with crRNA designed by us and directed against regions that surround exon 7 of the BRCA2 gene.

Results: The evaluation of BRCA2 mRNAs showed the presence of several splicing isoforms expressed in different relative amounts. Our results also indicate that the most abundant isoform (~ 66%) is degraded by NMD (Nonsense Mediated Decay) mechanism. Western blot analysis showed the presence of the BRCA2 protein (400kDa) in patients' cells with the size equivalent to that of control cells, but in a smaller amount. Functional studies point to a significant reduction in the formation of RAD51 foci, a mark of defect in the function of BRCA2. In order to increase the levels of BRCA2 protein expressed in mutated cells, we proceeded to modify the genome using CRISPR-Cas9 technology in order to modulate the splicing pattern and restore the reading frame, thus preventing NMD mRNA degradation.

Conclusions: Cellular and molecular assays performed reveal that the mutation causes the degradation of mutated mRNAs and decreases the expression of the BRCA2 protein, which interferes with HRR function. Through genetic editing, we were able to modulate the splicing pattern and increase the expression of a stable mRNA isoform. There are ongoing experiments to determine the functionality of the translated BRCA2 protein from these mRNA isoforms. Our study may pave the way for the correction of genomic defects by modulating splicing in hereditary breast cancer syndrome.

**Alunos** | Students: Maria Margarida Vidal Grilo, Raquel Maria Meirim Antunes

**Tutores** | Tutors: Noélia Maria Fernandes Custódio

**Laboratório, Centro, Unidade |** Laboratory, Centre, Unit**:** Maria Carmo-Fonseca Lab, iMM-JLA

**E-mail:** mariamargaridagrilo@campus.ul.pt; raquel.maria.antunes@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC/23**

**Título:**

Title: Why does BRCA loss of function predisposes to tumors mainly in estrogen-related tissues?

**Palavras-Chave:** Carcinogénese específica, genes BRCA1/2, dano no DNA mediado por estrogénio

**Resumo:**

As mutações BRCA1 e BRCA2 são as principais drivers do cancro da mama e ovário hereditários. BRCA1 e BRCA2 são proteínas supressoras de tumor, com funções cruciais na manutenção da estabilidade genómica. As proteínas BRCA1 e BRCA2 desempenham um papel importante na reparação de *double-strand DNA breaks* (DBSs) por recombinação homóloga. Estudos recentes demonstraram que BRCA1 e BRCA2 são também essenciais no turnover de R-loops, pelo que a depleção de BRCA está associada a um aumento da acumulação de R-loops, com consequente dano no DNA.

BRCA1 e BRCA2 estão expressas na maioria dos tecidos. Dado que a função fisiológica de BRCA como proteínas supressoras de tumor parece ubíqua, por que é que as mutações germinativas no gene BRCA predispõem maioritariamente a carcinogénese em tecidos dependentes de estrogénio, nomeadamente mama e ovário? Esta é a questão que motivou o nosso projeto.

A nossa hipótese consiste em que as mutações BCRA1 e BCRA2 estão associadas a carcinogénese em tecidos dependentes de estrogénio pelo efeito sinérgico entre a deficiência na reparação de DBSs e o dano no DNA induzido pelo estrogénio. O estrogénio poderá induzir este dano no DNA pelo efeito genotóxico dos seus metabolitos e/ou pela acumulação de R-loops.

No nosso projeto, iremos usar células de dadoras portadoras de mutações em heterozigotia nos genes *BRCA1* (*BRCA1* c.3612delA) ou *BRCA2 (BRCA2* 156_157insAlu) e de controlos *BRCA* wild-type. Iremos utilizar fibroblastos da pele e organoides de mama derivados de iPSCs. Iremos tratar estas células com estrogénio e os metabolitos 2-hidroxiestradiol (2-OHE2) e 4-hidroxiestradiol (4-OHE2) e avaliar, por imunofluorescência, a presença de DSBs (através da quantificação de gamaH2AX), o recrutamento da proteína reparadora de DNA RAD51 e a formação de R-Loops (com o anticorpo monoclonal S9.6). Finalmente, iremos comparar a recuperação das DSB induzidas nas células com deficiência de BRCA com as células controlo BRCA *wild-type*.

Os fibroblastos provenientes de dadoras portadoras de mutação BRCA foram obtidos por biópsias de pele e as *induced pluripotent stem cells* (iPSCs) foram geradas através da transdução de fibroblastos da pele com vectores de virus Sendai (SeV) que codificam *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, e *c-MYC*. O vector SeV, um vector de RNA citoplasmático, fica ausente das células hospedeiras após a propagação por 10-13 passagens. Estas hiPSCs expressam marcadores de células estaminais e têm um cariótipo normal. Adicionalmente, está a ser realizada a diferenciação dessas iPSCs em organóides de mama que serão usados no nosso estudo.

Key-Words: Tissue-specific carcinogenesis, BRCA1/2 genes, estrogen-mediated DNA damage

**Abstract:**

BRCA1 and BRCA2 mutations are the main drivers of hereditary breast and ovarian cancer. BRCA1 and BRCA2 are tumour suppressor proteins, with crucial roles in maintaining genomic stability. It is well-established that BRCA1 and BRCA2 proteins play an important part in the repair of double-strand DNA breaks (DSBs) by homologous recombination. Recent studies have shown that BRCA1 and BRCA2 are also essential in the turnover of R-loops, therefore BRCA depletion is associated with an increase in R-loop accumulation, and consequent DNA damage.

BRCA1 and BRCA2 are expressed in most tissues. Given that BRCA physiological roles as tumour suppressor proteins seem relevant ubiquitously, why are germline BRCA gene mutations mainly predisposing to cancer in estrogen-related tissues, namely breast and ovarian cancers? This question motivated our project.

We hypothesise that BRCA1 and BRCA2 mutations cause cancer in estrogen-regulated tissues by a synergistic effect between double-strand DNA breaks repair deficiency and estrogen-induced DNA damage. Estrogen might induce DNA damage due to the effect of genotoxic metabolites and/or to the accumulation of R-loops.

In our project, we will use cells from carriers of heterozygous mutations in either *BRCA1* (*BRCA1* c.3612delA) or *BRCA2 (BRCA2* 156_157insAlu) genes and from *BRCA* wild-type controls. We will use human skin fibroblasts and mammary-like organoids derived from iPSCs. We will treat these cells with estrogen, the estrogen metabolites 2-hydroxyestradiol (2-OHE2) and 4-hydroxyestradiol (4-OHE2) and evaluate, by immunofluorescence, the presence of DSBs (through the quantification of gamaH2AX), the recruitment of the DNA repair protein RAD51 and the formation of R-Loops (with the monoclonal antibody S9.6). Finally, we will compare the recovery of induced double-strand DNA breaks in BRCA deficient cells with BRCA wild-type controls.

Fibroblasts from the *BRCA* mutation carriers were derived from skin biopsies and induced pluripotent stem cells (iPSCs) were generated by transducing the skin fibroblasts with Sendai virus (SeV) vectors encoding *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, and *c-MYC*. SeV vector, a cytoplasmic RNA vector, is lost from host cells after propagation for 10–13 passages. These hiPSCs express stem cell markers and have normal karyotypes. Further differentiation of these iPSCs into mammary-like organoids is being performed and they will be used in our study.

**Alunos** | Students: Rita Sequeira

**Tutores** | Tutors: Isabel Alcobia, Hélia Neves

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Histologia e Biologia do Desenvolvimento

**E-mail:** ritasequeira@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC/27**

**Título: O papel imunorregulador da eHSP90 na ativação de macrófagos em ambiente tumoral**

Title: The immunomodulatory role of eHSP90 on macrophage activation in tumour microenvironment.

**Palavras-Chave:** HSP90; macrófagos pró-inflamatórios, microambiente tumoral

**Resumo:**

A Heat Shock Protein (HSP) 90 é uma proteína chaperonina com ações importantes no cancro, em particular na conformação e função de proteínas "client" importantes na oncogénese. Dados recentes demostram que a sua forma extracelular (eHSP90) promove a metastização, tornando-a num potencial alvo terapêutico anti-tumoral.

Em projetos GAPIC anteriormente realizados no nosso laboratório, foram avaliados os efeitos de um novo anticorpo bloqueante da ação da eHSP90 (α-eHSP90)*. Em ensaios *in vitro,* verificou-se que o α-eHSP90 reduz a capacidade invasiva das células, levantando a hipótese da sua utilização futura como fármaco anti-tumoral. Para melhor compreender a ação da eHSP90 no microambiente tumoral, questionámo-nos se esta tem efeitos imunorreguladores na polarização de macrófagos associados a tumor (MAT). Tumores com níveis elevados de MAT pró-inflamatórios (M1) associam-se a melhor prognóstico. Os resultados obtidos em contexto de microambiente tumoral de cancro do ovário mostram uma diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias na polarização M1 quando é inibida a actividade da eHSP90.

O presente projeto pretende saber se a atividade da eHSP90 na ativação M1 é especifica do tipo de tumor. Mais concretamente, este estudo tem objectivo avaliar o efeito imunorregulador da eHSP90 na polarização M1 no contexto do microambiente tumoral de melanoma.

Para isso, macrófagos humanos foram ativados e co-cultivados *in vitro* com a linha de células tumorais SKMEL28 (melanoma). Sucintamente, monócitos foram isolados de sangue de dadores anónimos e saudáveis, e diferenciados em macrófagos (M0) durante 7 dias. Para estudar o efeito do bloqueio da eHSP90 durante a ativação M1, os macrófagos M0 foram polarizados durante 2 dias, em co-cultura com células SKMEL28, na presença (condição bloqueio) ou ausência (condição controlo) de α-eHSP90. Em cada estadio do desenvolvimento, foram recolhidas células e caracterizadas por citometria de fluxo, usando os marcadores de superfície celular CD14, CD91, CD64 e CD1a. Paralelamente, os sobrenadantes M0 e M1 foram recolhidos para análise do perfil de citocinas inflamatórias.

Os resultados preliminares da caracterização fenotípica mostraram uma diminuição da expressão de CD14, CD91 e CD64 em M0, quando comparados com os monócitos. M0 e M1 apresentaram perfis semelhantes dos marcadores de superfície celular. A análise dos sobrenadantes para a secreção de citocinas está em estudo.

No futuro, serão estudadas mais amostras. A especificidade dos efeitos imunorreguladores de eHSP90 na polarização M1 será avaliada comparando os resultados obtidos com os dados previamente recolhidos no contexto de cancro do ovário: efeitos semelhantes nos dois tipos de tumor, sugere um mecanismo comum da eHSP90 na ativação M1; efeitos diferentes sugere que a acção da eHSP90 na imunomodelação M1 é dependente do tipo de microambiente tumoral.

* Os resultados do projeto estão sujeitos a acordo de confidencialidade (Pharmis Biofarmaceutica)

Key-Words: HSP90; pro-inflammatory macrophage; tumor microenvironment

Abstract:

The Heat Shock Protein (HSP) 90 is a chaperon protein with essential roles in cancer, namely in the maintenance of the stability, integrity, conformation, and function of some "client" key oncogenic proteins. Recently, it has also been shown that the extracellular form of HSP90 (eHSP90) is involved in tumor invasiveness, making it a potential therapeutic target in cancer.

In previous GAPIC projects of our laboratory, it was studied the effects of a new antibody that blocks the activity of eHSP90 (α-eHSP90)*. The *in vitro* data showed that α-eHSP90 reduces the invasive capacity of cancer cells, suggesting a potential application of this drug in cancer treatment. To further understand the action of eHSP90 in the tumor microenvironment, we then asked if it has an immunomodulatory role in tumor-associated macrophages (TAM) polarization. Tumors with high levels of pro-inflammatory TAM (M1) are associated with a better prognosis. The results obtained showed a decrease in the secretion of pro-inflammatory cytokines when eHSP90 was blocked during M1 polarization, in the context of ovarian cancer microenvironment. We are currently exploring whether the activity of HSP90 in M1-activation is tumor-specific. In particular, this research project aims to explore the immunomodulatory action of eHSP90 on M1 polarization in the melanoma tumor microenvironment.

For that, we used an *in vitro* assay to activate human macrophages in a co-culture system with SKMEL28 (melanoma) cell line. Briefly, monocytes were isolated from blood samples obtained from healthy anonymous donors and differentiated in macrophages (M0) for seven days. To study the effect of blocking eHSP90 during M1-activation, M0 was co-cultured for 48h with SKMEL28 cells either in the presence or absence of α-eHSP90 (blocking or control conditions, respectively). For each stage studied, cells were collected and analyzed by flow cytometry using cell-surface markers CD14, CD91, CD64, and CD1a. In parallel, M0 and M1 supernatants were collected to perform the analysis of inflammatory cytokines-profile.

Our preliminary results showed a decrease in the expression of CD14, CD91, and CD64 in M0 when compared with isolated monocytes, and a similar profile to M1. The analysis of the supernatants is now under evaluation to determine the profiles of secretory inflammatory cytokines.

In the future, the study will be expanded to more samples. To evaluate if the immunomodulatory effects of eHSP90 in M1-polarization are tumor-type specific, we will compare our results with the previous data collected in the ovarian cancer context. If the results are similar, they strongly suggest a common mechanism of eHSP90 in M1-activation, irrespectively of tumor-type. If the cytokine profiles are different, it suggests a tumor-specific action of eHSP90 on immunomodulation of M1.

* Results subject to a confidentially agreement (Pharmis Biofarmaceutica)

**Alunos** | Students: Francisco António de Aguilar Baptista

**Tutores** | Tutors: Sandra Cristina Cara de Anjo Casimiro

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Luís Costa Lab, iMM-JLA

**E-mail:** faabaptista@campus.ul.pt ; scasimiro@medicina.ulisboa.pt

**Projecto** | Project **PEC$_{22}$/07**

**Título: Eficácia de OPG-Fc e palbociclib no tratamento de cancro de mama com sobreexpressão de RANK resistente aos CDKi: estudo em modelo animal**

Title: Efficacy of OPG-Fc plus Palbociclib to treat RANK overexpressing CDKi-resistant breast cancer: a proof-of-concept xenograft trial

**Palavras-Chave:** Recetor ativador do NFkB (RANK); Inibidor das cinases dependentes das ciclinas (CDKi); Terapia alvo

**Resumo:**

O cancro de mama (CM) metastático tem uma sobrevivência a 5 anos de apenas 25%, sendo responsável por 600.000 mortes por ano, 1700 em Portugal. Atualmente, os inibidores das cinases dependentes das ciclinas (CDKi) 4 e 6 estão aprovados para o tratamento de CM metastático recetor de estrogénios positivo (RE+), em combinação com hormonoterapia (HT). Ainda que a resistência aos CDKi seja quase inevitável na maioria dos doentes, biomarcadores preditivos de resposta ou fármacos que aumentem a sua eficácia são desconhecidos. A cascata de sinalização do recetor ativador do NFkB (RANK) participa em todas as fases do CM. Recentemente, descobrimos que células com sobreexpressão de RANK (RANK OE) RE+/HER2- demonstram um fenótipo estaminal e mesenquimatoso, com inferior taxa de proliferação e menor sensibilidade à quimioterapia, HT e aos CDKi. O bloqueio da via RANK foi capaz de restabelecer a sensibilidade à terapêutica nestas células. Adicionalmente, questionámos se a expressão de RANK relaciona-se com a resistência intrínseca do CM triplo-negativo (TNBC) aos CDKi; confirmámos a nossa hipótese pelo RANK *KD*, que sensibilizou a linha celular MDA-MB-231, pRB *wild-type*, aos CDKi. De seguida, observámos *in vitro* que o bloqueio da via RANK é capaz de sensibilizar TNBC aos CDKi, independentemente de mutações no pRB, sugerindo que na clínica a expressão de RANK no CM pode ser um preditor de resistência aos CDKi, e que a sua inibição pode sensibilizar o CM aos CDKi.

Assim, o nosso objetivo foi demonstrar *in vivo* a eficácia do bloqueio da via RANK com OPG-Fc (OPG), em combinação com CDKi, no tratamento de RANK OE ER+/HER2- BC e TNBC.

Para tal, utilizámos em todos os ensaios modelos de ratinhos NSG com xenoenxertos ectópicos. No ensaio XenoLu2, inoculámos subcutaneamente células ER+ MCF7 (parentais ou OE). Estas foram tratadas durante 21 dias com placebo, OPG, Palbociclib (Palbo) + Fulvestrant (Fulv) – *standard of care* – ou Palbo+Fulv+OPG (combinação experimental). Nos ensaios Xeno4 e 5, inoculámos células de TNBC MDA-MB-231 ou 468, respetivamente, sendo as últimas pRB mutado. Estes ratinhos foram tratados 21 dias com placebo, OPG, Palbo ou Palbo+OPG. O tamanho tumoral foi avaliado a cada 3 dias com craveira. Os tecidos foram criopreservados ou fixados. O Ki67 e p-pRB foram quantificados por Imunohistoquímica e *Immunoscore* (FiJi).

No ensaio XenoLu2, observámos que a OPG *per se* desbloqueou não só o crescimento in vivo das células RANK OE, mas também aumentou o crescimento de xenoenxertos com baixa expressão de RANK. Neste ensaio, ainda que não exista um benefício do tratamento Palbo+Fulv+OPG em comparação com o Palbo+Fulv (*standard of care)*, observámos uma tendência sugestiva da sensibilização dos xenoenxertos RANK OE ao Palbo+Fulv com a OPG. Já no ensaio Xeno4 (com xenoenxerto com pRb *wild-type*), Palbo+OPG foi mais eficaz na prevenção do crescimento tumoral que Palbo isoladamente. Estes resultados são corroborados pelas quantificações obtidas do Ki67 e p-pRb (a jusante na via do CDK4/6).

Concluímos que *in vivo* o bloqueio com OPG-Fc poderá diminuir a resistência à terapêutica *standard* no CM ER+/HER2-; e poderá ter um efeito benéfico, comparativamente ao Palbo isoladamente, no TNBC com pRB *wild-type*. Estes resultados corroboram a evidência de que a inibição do RANK poderá sensibilizar CM aos CDKi, suportando o design de um ensaio clínico de fase II onde pode ser testada a eficácia do Denosumab (anticorpo anti-RANKL) mais CDKi versus CDKi isoladamente, em doentes com CM metastático ER+/HER2- e/ou TNBC.

Key-Words: Receptor activator of NFkB (RANK); Cyclin-dependent kinase (CDKi); Molecular Targeted Therapy

Abstract:

Advanced breast cancer (BC) has a 5-year relative survival rate of only 25%, kills over 600 000 women each year, 1700 in Portugal. On estrogen receptor positive (ER+) advanced BC, cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitors (CDKi) were recently approved in combination with endocrine therapy (ET). Although resistance to CDKi is considered a near-inevitability in most patients, predictive biomarkers of response and which drugs may improve CDKi efficacy are an unmet clinical need. The receptor activator of NFkB (RANK) signalling pathway plays a crucial role in all stages of BC. Recently, our group found that RANK overexpressing (RANK OE) ER+/HER2- BC is characterized by a staminal and mesenchymal phenotype, with decreased proliferation rate and decreased susceptibility to chemotherapy, ET and CDKi. Importantly, we found that blockage of RANK-pathway restored sensitivity to therapy in RANK OE ER+ BC cells. Based on these findings, we questioned if RANK expression could also be linked to the intrinsic resistance of triple-negative BC (TNBC) to CDKi; and confirmed our hypothesis by RANK *KD*, which was able to sensitise the pRB proficient MDA-MB-231 TNBC cell line to CDKi. Subsequently, we observed *in vitro* that RANK pathway blockage is able to sensitize TNBC cell lines to CDKi, independently of pRB status, suggesting that in the clinical setting not only the expression of RANK in BC may predict resistance to CDKi, but also RANK inhibition may sensitize BC to CDKi.

Therefore, our goal was demonstrating *in vivo,* using xenograft models, the efficacy of RANK-pathway blockage with OPG-Fc (OPG) in combination with CDKi, in RANK OE ER+ BC and TNBC.

We used ectopic xenograft models to assess therapy efficacy. In our XenoLu2 trial, NSG mice were inoculated subcutaneously in the flanks with MCF-7 ER+/HER2- BC cells (parental or RANK OE). Mice were treated for 21 days with vehicle, OPG, Palbociclib (Palbo) + Fulvestrant (Fulv) (standard of care) or Palbo+Fulv+OPG (experimental combination). In our Xeno4 and 5 trials, NSG mice were inoculated with MDA-MB-231 or 468 TNBC cells, respectively, with the latter being pRB deficient. Mice were treated for 21 days with vehicle, OPG, Palbo, or Palbo+OPG. Tumour growth was monitored every 3 days with a caliper. Tissues were cryopreserved or fixed for analysis. Ki67 and p-pRB (Ser807/811) were quantified by immunohistochemistry and Immunoscore (FiJi).

In XenoLu2 trial, we observed that OPG *per se* was able to unlock the RANK-dependent restrained growth of RANK OE cells *in vivo*, but also to increase the growth of RANK-low BC xenografts. Although Palbo+Fulv+OPG had no benefit over the standard of care Palbo+Fulv in RANK-low xenografts, we observed a suggestive trend for sensitization of RANK OE xenografts to Palbo+Fulv by OPG. Exclusively in Xeno4 trial (with pRb proficient xenograft), Palbo+OPG was more effective in preventing tumour growth than Palbo alone. Ki67 (proliferation) and p-pRb (downstream of CDK4/6) immunostaining corroborated these findings.

We conclude that blockage of RANKL with OPG may overcome resistance to this therapy in Luminal BC; and has potential benefit over Palbo alone in TNBC RB-proficient cell lines *in vivo*. These results provide evidence that RANK inhibition may sensitize BC to CDKi, supporting the design of a phase II clinical trial where the efficacy of denosumab (anti-RANKL antibody) plus CDKi versus CDKi alone, in patients with metastatic ER+/HER2- RANK OE BC and/or TNBC.

**Alunos** | Students: José Guilherme Gonçalves Nobre

**Tutores** | Tutors: Alberto Escalda, Diogo Alpuim Costa

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: CCUL (Centro Cardiovascular da Universidade de Lisboa)

**E-mail:** joseguilhermenobre@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC$_{21}$/39**

**Título: Oxigenoterapia Hiperbárica: o limite entre o saudável e o cancerígeno.**

Title: Hyperbaric Oxygenotherapy: the limit between cancer and healthy.

**Palavras-Chave:** OHB, Hipóxia, neoplasia pancreática

**Resumo:**

O tumor do pâncreas **é** bastante resistente à quimio e radioterapia (QT e RT) por apresentar hipoxia, devido essencialmente a 2 mecanismos: hipoxia e hiperóxia prolongada. O primeiro relacionado com a transição epitélio-mesenquimal (TEM), o segundo estar associado com a acumulação de radicais livres que ativa a via MAPK, conduzindo à morte celular e consequente disfunção de órgão. Este mecanismo foi galardoado com o Nobel da Medicina de 2019. Assim: **têm-se procurado mecanismos de reversão desta hipoxia. Um deles é a** Oxigenoterapia Hiperbárica (OHB) que consiste no uso de $O_2$ a pressões superiores à pressão atmosférica, promovendo uma maior quantidade de $O_2$ dissolvido no plasma, o que aumenta a quantidade do mesmo nas células. Deste modo, incrementamos a angiogénese nas regiões hipóxicas e produzimos espécies reativas de oxigénio (ERO), que aumentam o stress celular e causam maior dano às células cancerígenas. Poucos estudos foram realizados aplicando a OHB a cancro, daí surgiu a nossa intenção de expandir o conhecimento nesta área.

O objetivo principal é caracterizar a proliferação e crescimento celular, a autofagia, o stress oxidativo, a TEM e a metastização, em condições OHB, em células saudáveis e cancerígenas. Para além disso, pretende-se avaliar o efeito da OHB como coadjuvante de uma QT convencional, tal como verificar se existe uma diminuição de efeitos nocivos dos agentes de QT, em células saudáveis submetidas a OHB. Outro objetivo consiste em verificar se o tabaco diminui a eficácia do tratamento.

Quanto à metodologia, iniciou-se cultura celular de 4 linhagens de células de adenocarcinoma do pâncreas e uma linhagem de células saudáveis do pâncreas, no LCosta Lab, assim como serão realizados ensaios de viabilidade. De seguida, dividiram-se em 12 grupos, de acordo com as variáveis: célula saudável/cancerígena, exposição a OHB, exposição à gencitabina e exposição ao tabaco. Quanto à exposição à OHB, esta vai ser realizada na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, numa Câmara Hiperbárica sob as seguintes condições: 2.5 atm, durante 90'. Após a exposição, será feita extração proteica. Em seguida, os extratos serão avaliados por western-blot, através de marcadores de TEM, de células estaminais, angiogénese e hipoxia.

Por o estudo ainda se encontrar a decorrer, não é possivel revelar os resultados nem as conclusões. Contudo, isto será a 1ª fase do estudo. Após os resultados com culturas celulares, tencionamos transpor estas conclusões para modelo animal *in vivo*, com o objetivo de avaliar se os mesmos pressupostos se verificam. Quiçá num futuro próximo, e com base nas conclusões deste projeto, poderemos ter uma terapêutica oncológica (QT, RT, terapias biológicas alvo e imunoterapia) com uma diminuição ou ausência de efeitos secundários, maior eficácia do tratamento e ainda uma melhor qualidade de vida para o doente.

Key-Words: HBO, hypoxia, pancreatic neoplasm

Abstract:

Pancreatic tumors are quite resistant to chemotherapy and radiotherapy (QT and RT) due to the fact that they present hypoxia, which is essentially due to 2 mechanisms: hypoxia and prolonged hyperoxia. The first is related to the epithelium-mesenchymal transition (TEM), while the second is associated with the accumulation of free radicals that activate the MAPK pathway, leading to cell death and consequent organ dysfunction. This mechanism was awarded the 2019 Nobel Prize in Medicine. Therefore, mechanisms to reverse this hypoxia have been sought. One of them is Hyperbaric Oxygen Therapy (OHB) whose rationale consists of using $O_2$ at pressures higher than atmospheric pressure, leading to a greater amount of dissolved $O_2$ in the plasma, which increases the amount of it in the cells. In this way, we increase the angiogenesis in hypoxic regions and produce reactive oxygen species (ROS), which increase cellular stress and cause greater damage to cancer cells. Few studies have been conducted applying OHB to cancer, hence our intention to expand knowledge in this area.

The main objective is to characterize cell proliferation and growth, autophagy, oxidative stress, TEM and metastatization, under OHB conditions, in healthy and cancer cells. In addition, it is intended to evaluate the effect of OHB as an adjunct to conventional QT, such as verifying whether there is a decrease in the harmful effects of QT agents in healthy cells subjected to OHB. Another objective is to verify if tobacco decreases the effectiveness of the treatment.

As for the methodology, cell culture of 4 cell lines of pancreatic adenocarcinoma cells and one cell line of healthy pancreatic cells has been started at LCosta Lab, as well as viability tests. Then, they were divided into 12 groups, according to the variables: healthy/cancer cell, OHB exposure, gencitabine exposure and tobacco exposure. As for the OHB exposure, it will be carried out at the Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, in a Hyperbaric Chamber under the following conditions: 2.5 atm, for 90'. After the exposure, protein extraction will be done. Then, the extracts will be evaluated by western-blot, through markers of stem cells, TEM, angiogenesis and hypoxia.

Since the study is still ongoing, we cannot yet reveal the results or conclusions. However, this will be the first phase of the study. After the results with cell cultures, we intend to transpose these conclusions into an *in vivo* animal model, with the intention to assess whether the same assumptions are true. Further, with this conclusions, we will have an oncological therapy (QT, RT, target biological therapies and immunotherapy) with a decrease or absence of side effects, more efficacy of the treatment and still a better quality of life for the patient.

# Sessão de Posters III

PAINEL

Catarina Fonseca | Lia Neto | Luísa Lopes | Sara Xapelli | Sofia Reimão

**Alunos** | Students: Tatiana Duque

**Tutores** | Tutors: Mamede de Carvalho

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Mamede de Carvalho Lab, iMM-JLA

**E-mail:** tatianaduque@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC/07**

# Título: A influência dos níveis séricos de TDP-43 na Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)

Title: The influence of TDP-43 in TGF- ß serum levels in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)

**Palavras-Chave:** ALS; Progressão da Doença; TDP-43

**Resumo:**

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por uma progressiva paralisia muscular. É a doença do neurónio motor mais frequente, afetando, mundialmente, 1 em cada 20,000 indivíduos.

A progressão da doença é clinicamente avaliada pela aplicação de uma escala funcional, ALS-Functional Rating Scale-revised (ALSFRS-R), a qual monitoriza a progressão da incapacidade nos doentes com ELA. Desta forma, o estado respiratório inicial e o seu declínio com a progressão da doença são fortes preditores independentes de sobrevida e podem, facilmente, ser avaliados pela capacidade vital forçada (CVF).

O Riluzole, um inibidor da neurotransmissão glutamatérgica, é o único fármaco que provou aumentar a sobrevida, sendo, por isso, essencial o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

As citocinas pertencentes à família Transforming growth factor-β (TGF-β) são importantes reguladores celulares, influenciando tanto a neurogénese, como os processos neurodegenerativos. Vários estudos demonstraram que a sinalização do TGF-β protege os neurónios da excitotoxicidade mediada pelo glutamato, mecanismo este subjacente à patogénese de diversas doenças neurodegenerativas, como a ELA.

Estudos recentes demonstraram que a desregulação do sistema TGF-β é uma alteração comum em doenças neurodegenerativas, tendo sido a sobre regulação deste sistema correlacionada com a progressão de ELA.

O objetivo da primeira fase do projeto consiste em testar os níveis séricos de TGF-β como marcadores independentes de progessão de ELA.

De forma a testar esta hipótese, quantificámos, por Multiplex Assay, os níveis séricos de TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3 em doentes com ELA e num grupo controlo compostos por indivíduos não doentes. Os nossos resultados preliminares publicados demonstraram que os níveis de TGF-β3 são, tendencialmente, superiores nos doentes com ELA, em comparação com o grupo controlo. Face a este resultado, procurámos explorar este marcador por ELISA numa maior população de doentes e grupos controlo, sendo que ainda aguardamos os resultados.

As proteínas morfogenéticas ósseas (PMOs) também fazem parte da família Transforming growth factor-β (TGF-β) e apresentam inúmeras funções na célula, atuando não só como reguladores na neurogénese e gliogénese no córtex dos mamíferos, como também como reguladores na astrogliogénese, em processos inflamatórios e na diferenciação de células neuronais progenitoras em locais de lesão. Uma vez que fazem parte da mesma família, tanto as PMOs como TGF-β partilham cascatas semelhantes nas suas vias de sinalização.

Uma das formas hereditárias mais frequentes de ELA resulta da agregação de Tar DNA-binding protein 43 (TDP-43) na sua forma mutada e propensa à agregação. Foi provado que formas mutadas de TDP-43 interferem nos processos de neurodegeneração. Estudos em Drosophila demonstraram que tanto o ganho como a perda de função de TDP-43 causam uma redução na sinalização de PMOs nas junções neuromusculares, sugerindo, assim uma alteração na sua sinalização na ELA.

O objetivo da segunda parte do nosso projeto consiste em correlacionar os níveis de TDP-43 e PMO com os níveis de TGF-β. Para tal estudaremos a expressão destas proteínas por ELISA nas populações estudadas na primeira fase do projeto.

Em suma, é evidenciada uma desregulação do sistema TGF-β na ELA, condicionando, dessa forma um aumento dos níveis séricos de TGF-β nos doentes. Este marcador inflamatório poderá, assim, ser um promissor alvo terapêutico. No entanto, é necessário que estas quantificações sejam repetidas em amostras de maiores dimensões. Também TDP-43 parece interferir nos processos de neurodegeneração. Este projeto contribuirá assim para a descoberta de novos marcadores de ELA (PMOs, TGF-β e TDP-43) e futuros alvos terapêuticos.

Key-Words: ALS, Disease-progression; TDP-43

Abstract:

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by progressive muscle paralysis. It is the most frequent motor neuron disease, affecting 1 per 20,000 people worldwide.

Disease progression is clinically evaluated by the application of the functional scale ALS-Functional Rating Scale-revised (ALSFRS-R), which monitors the progression of disability in patients with ALS. Respiratory complications are the main cause of death in ALS. For this reason, initial respiratory status and its decline over disease progression are strong independent predictors of survival and can be easily accessed by forced vital capacity (FVC).

Riluzole, a glutamatergic neurotransmission inhibitor, is the only drug that has shown to extend survival. Therefore, new treatment strategies are needed.

Transforming growth factor-β (TGF-β) family cytokines are important regulators of cell fate affecting both neurogenesis and neurodegeneration. Several studies demonstrate that TGF-β signalling protects neurons from glutamate-mediated excitotoxicity, a recognized mechanism underlying the pathogenesis of various neurodegenerative disorders such as ALS.

Recent studies report dysregulations of the TGF-β system as a common feature of neurodegenerative disorders. The upregulation of this system has been linked with ALS progression.

Our objective in the first part of this project is to test TGF-β serum levels as independent markers of disease progression in ALS patients.

In order to test this hypothesis, we measured TGF-β1, TGF-β2 and TGF-β3 serum levels in ALS patients and in control groups (composed by non-sick individuals) by Multiplex Assay. Our published preliminary results have shown that TGF-β3 levels seem to be trendily higher in ALS patients, than in control groups. Thus, we analysed the expression of this marker by ELISA in a bigger population of patients and controls and we are still waiting for the results.

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are also part of the Transforming Growth factor-β (TGF-β) superfamily and have numerous cell functions. Not only do they act as regulators of neurogenesis and gliogenesis in the mammalian cortex, but they also regulate astrogliosis, inflammatory processes and neural progenitor cell differentiation at an injury site. As part of the same family, BMPs and TGF-β signaling share similar cascades.

One of the most frequent inheritable forms of ALS results from aggregation-prone mutations in Tar DNA-binding protein 43 (TDP-43). Altered TDP-43 has been proved to interfere with neurodegeneration. Studies in *Drosophila* have shown that both loss and gain of function of TDP-43 cause a reduction of BMP signaling at the neuromuscular junction, thus, suggesting BMP signaling to be altered in ALS.

Our aim in the second part of this project is to correlate TDP-43 and BMP levels with TGF-β levels. In order to do that, we will study the expression of these proteins by ELISA in the populations previously studied in the first part of the project.

In conclusion, there seems to be a dysregulation of the TGF-β system in ALS, leading to higher TGF- β serum levels in ALS patients, thus, suggesting this inflammatory marker to be a promising treatment target. However, in order to support this statement, further quantifications should be held with larger samples. Also, TDP-43 seems to interfere with neurodegeneration. This project will, then, contribute to the discovery of new disease markers (BMPs, TGF-β and TDP-43), and new treatment targets.

**Alunos** | Students: Pedro Guilherme Alves Dias

**Tutores** | Tutors: Sara Xapelli, Rui Rodrigues

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Ana Sebastião Lab, iMM-JLA

**E-mail:** pedroguilherme@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC/08**

# Título: Descodificando a gliogénese pós-natal no contexto da depressão: ações do exercício e dos recetores canabinóides tipo 2

Title: Decoding adult gliogenesis in the context of depression: exercise and cannabinoid type 2 receptor actions

**Palavras-Chave:** Depressão, Gliogénese pós-natal, neuroregeneração

## Resumo:

Fundamento: A depressão é a doença psiquiátrica com maior incidência globalmente. No entanto, não existe ainda um tratamento totalmente eficaz. [1]

Nos últimos anos, tem vindo a ser estudada a ligação entre depressão e citogénese pós-natal no hipocampo (AHC)[2]. Estratégias para aumentar a AHC mostram uma melhoria dos estados depressivos.[3] Além disso, a neurogénese pós-natal é necessária para que ocorram os efeitos antidepressivos destes fármacos.[4] Finalmente, a terapia antidepressiva é dependente das células da glia, sugerindo um papel fundamental destas células como mediadoras de comportamentos depressivos.[5]

O sistema endocanabinóide (ECS) e o exercício físico (PE) são importantes reguladores das células estaminais neuronais adultas (aNSCs)[6,7]. De facto, a modulação dos recetores de canabinóides do tipo 2 (CB2Rs) controla diferentes estádios da neurogénese no hipocampo.[8] Além disso, existe uma conexão entre o ECS e o PE. Enquanto o PE promove um aumento dos endocanabinóides em circulação,[9] estas substâncias são necessárias, via recetores de canabinóides do tipo 1 para aumentar a citogénese[10] e para mediar efeitos antidepressivos.[11] Apesar do papel regulador do ECS nas aNSCs estar bem estabelecido,[7] o impacto dos CB2R e PE na gliogénese pós-natal ainda não é totalmente conhecido.

Objetivos: Este projeto de investigação tem como objetivo caraterizar *in vitro* os efeitos da modulação CBR2 e de fatores relacionados com o PE nas aNSCs de modo a clarificar o papel destes fatores na gliogénese pós-natal. Como primeira abordagem, foi avaliada a oligodendrogénese pós-natal.

Métodos: Neurosferas do giro dentato foram obtidas de murganhos C57Bl6 recém-nascidos e expostas a moduladores dos CBR2 (agonista HU308, antagonista AM630) e vários fatores relacionados com o PE, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em diferentes concentrações. A proliferação celular foi analisada por imunocitoquímica através da marcação com 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) e NG2 (neuron-glial antigen 2) enquanto a diferenciação dos oligodendrócitos foi analisada por imunocitoquímica através da marcação MBP (myelin basic protein).

Resultados: Dados preliminares sugerem um aumento do número de oligodendrócitos imaturos (células NG2+) promovido pelo tratamento com IGF-1. Para além disso a proliferação de oligodendrócitos manteve-se inalterada após modulação dos CB2Rs.

Conclusões: Estes resultados, apesar de inconclusivos dado o pequeno número de experiências, estão de acordo com a literatura recente sobre as ações do IGF-1 na produção e maturação de oligodendrócitos.[12] O número de experiências analisadas é baixo devido à atual situação pandémica, no entanto irão ser aumentados nos próximos meses. Em trabalhos futuros serão avaliadas as ações destes fatores na astrogliogénese pós-natal *in vitro* e *in vivo* enquanto potenciais alvos antidepressivos via gliogénese pós-natal.

**Referências:**

1 - Willner et al. (2013) The neurobiology of depression and antidepressant action. PMID: 23261405
2 - Schoenfeld et al. (2015) Adult neurogenesis and mental illness. PMID: 25178407
3 - Miller et al. (2015) The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. Current opinion in neurobiology. PMID: 25240202
4 - Oliveira et al. (2016) Glial Plasticity in Depression PMID: 27378858
5 - Rusznák et al. (2016) Adult Neurogenesis and Gliogenesis: Possible Mechanisms for Neurorestoration. PMID: 27358578
6 - Rodrigues et al. (2019) Cannabinoid Actions on Neural Stem Cells: Implications for Pathophysiology. PMID: 30959794
7 - Yau et al. (2016) Voluntary Wheel Running Reverses the Decrease in Subventricular Zone Neurogenesis Caused by Corticosterone. PMID: 27393316
8 - Rodrigues et al. (2017) Interaction between Cannabinoid Type 1 and Type 2 Receptors in the Modulation of Subventricular Zone and Dentate Gyrus PMID: 28848435
9 - Brellenthin et al. (2017) Endocannabinoid and Mood Responses to Exercise in Adults with Varying Activity Levels. PMID: 28319590
10 - Hill et al. (2010) Endogenous cannabinoid signaling is required for voluntary exercise-induced enhancement of progenitor cell proliferation in the hippocampus PMID: 19489006
11 - Heyman et al. (2012) Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans-Possible implications for reward and depression. PMID: 22029953
12 – Marta et al. (2007) Insulin-like growth factor type 1 receptor signaling in the cells of oligodendrocyte lineage is required for normal in vivo oligodendrocyte development and myelination. PMID: 17186502

Key-Words: Depression, Adult gliogenesis, Neurorepair

## Abstract:

Background: Depression is the psychiatric disease with the highest incidence worldwide. Nevertheless, successful treatment remains unachievable.[1]

In recent years, the connection between depression and adult hippocampal cytogenesis (AHC) has been unraveled.[2] AHC-enhancing strategies have been shown to ameliorate depressive-like states.[3] Moreover, AHC was found to be required for the effects of current antidepressants[4] Importantly, antidepressant pharmacotherapy is known to be dependent on glial cells, suggesting a pivotal role for these cells in mediating depressive-like behavior.[5]

The endocannabinoid system (ECS) and physical exercise (PE) were shown to be important regulators of adult neural stem cells (aNSCs) [6,7] In fact, cannabinoid type 2 receptors (CB2Rs) modulation has been shown to control several stages of hippocampal neurogenesis.[8] Importantly, there is an intricate connection between the ECS and PE. While PE was demonstrated to increase the circulating levels of endocannabinoids,[9] these substances were shown to be required, via type 1 cannabinoid receptors for exercise to increase cytogenesis[10] and to mediate several antidepressant effects.[11] Although the regulatory role of the ECS in aNSCs is well established, the actions of CB2R and PE in adult gliogenesis are yet to be determined.

Objectives: This research project aims to characterize *in vitro* the effects of CB2R modulation and exercise-regulated factors upon aNSCs to clarify the role of these players in postnatal gliogenesis. Postnatal oligodendrogenesis was assessed as a first approach.

Methods: Dentate gyrus neurospheres were obtained from newborn C57Bl6 mice and exposed to CB2R modulators (agonist HU308, antagonist AM630) and several exercise-regulated factors, brain derived neurotrophic factor (BDNF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1) or vascular endothelial growth factor (VEGF), at different concentrations. Cell proliferation was analyzed by 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and neuron-glial antigen 2 (NG2) staining and oligodendroglial differentiation by myelin basic protein (MBP) immunocytochemistry.

Results: Preliminary data suggests an increase in the number of immature oligodendrocytes (NG2+ cells) promoted by IGF-1 treatment. Moreover, oligodendroglial cell proliferation remained unaltered after CB2R modulation.

Conclusion: Present results, although inconclusive given the low number of experiments, go in line with current literature on the actions of IGF-1 signaling in the generation and maturation of oligodendrocytes.[12] The number of experiments analyzed up until now is low due to current pandemic situation but will be increased in the upcoming months. Future tasks will concern the evaluation of the actions of these factors in postnatal astrogliogenesis *in vitro* and *in vivo* as antidepressant targets via adult gliogenesis.

**References:**

1 - Willner et al. (2013) The neurobiology of depression and antidepressant action. PMID: 23261405
2 - Schoenfeld et al. (2015) Adult neurogenesis and mental illness. PMID: 25178407
3 - Miller et al. (2015) The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. Current opinion in neurobiology. PMID: 25240202
4 - Oliveira et al. (2016) Glial Plasticity in Depression PMID: 27378858
5 - Rusznák et al. (2016) Adult Neurogenesis and Gliogenesis: Possible Mechanisms for Neurorestoration. PMID: 27358578
6 - Rodrigues et al. (2019) Cannabinoid Actions on Neural Stem Cells: Implications for Pathophysiology. PMID: 30959794
7 - Yau et al. (2016) Voluntary Wheel Running Reverses the Decrease in Subventricular Zone Neurogenesis Caused by Corticosterone. PMID: 27393316
8 - Rodrigues et al. (2017) Interaction between Cannabinoid Type 1 and Type 2 Receptors in the Modulation of Subventricular Zone and Dentate Gyrus PMID: 28848435
9 - Brellenthin et al. (2017) Endocannabinoid and Mood Responses to Exercise in Adults with Varying Activity Levels. PMID: 28319590
10 - Hill et al. (2010) Endogenous cannabinoid signaling is required for voluntary exercise-induced enhancement of progenitor cell proliferation in the hippocampus PMID: 19489006
11 - Heyman et al. (2012) Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans-Possible implications for reward and depression. PMID: 22029953
12 – Marta et al. (2007) Insulin-like growth factor type 1 receptor signaling in the cells of oligodendrocyte lineage is required for normal in vivo oligodendrocyte development and myelination. PMID: 17186502

**Alunos** | Students: Gonçalo Lança Xerez Mendes Pechirra

**Tutores** | Tutors: Mamede de Carvalho

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Clínica Universitária de Neurologia

**E-mail:** gpechirra@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC/09**

**Título: *Split-hand* como marcador fisiológico do envelhecimento**

Title: Split-hand as a Physiological Marker of Ageing

**Palavras-Chave:** split-hand index, envelhecimento, esclerose lateral amiotrófica

**Resumo:**

Fundamento: A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa rapidamente progressiva na qual há perda tanto do primeiro como do segundo neurónio. O diagnóstico de ELA baseia-se na identificação de sinais clínicos, evidência de progressão da doença e alterações neurofisiológicas típicas. Sabe-se que a atrofia de músculos da mão é um sinal clínico inicial de ELA. Dentro dos músculos intrínsecos da mão, a atrofia ocorre predominantemente na eminência tenar, envolvendo tanto músculos de inervação mediana (abdutor curto do polegar (APB) e oponente do polegar) como músculos de inervação ulnar (primeiro interósseo dorsal (FDI), adutor do polegar e flexor curto do polegar), existindo uma relativa preservação dos músculos hipotenares (músculo abdutor do dedo mínimo (ADM)). Os mecanismos envolvidos neste padrão específico de atrofia muscular ("split-hand") são complexos e não estão completamente compreendidos.

Objetivos: Avaliar se o fenómeno "split-hand" ocorre no normal envelhecimento.

Métodos: Análise retrospetiva da amplitude da resposta motora nos músculos APB, FDI e ADM, bem como do split-hand index. Foram incluídos 244 doentes com suspeita de miastenia gravis que tiveram exclusão de doenças neuromusculares e nos quais os sintomas oculares se deviam a outras alterações. Foi efetuada uma avaliação da variação da amplitude da resposta, consoante o sexo e a idade, procurando compreender se a idade é um preditor independente do declínio do split-hand index. Foi realizada análise estatística descritiva utilizando medidas de tendência central e de dispersão.

Resultados: Dos 244 indivíduos a média de idade foi de 57,8 (±17,9) anos e 126 (51,6%) eram homens. Na avaliação da amplitude da resposta motora do APB a média foi de 7,793 (±2,378), do FDI a média foi de 11,886 (±2,859) e do ADM a média foi de 8,390 (±1,928). O split-hand index teve uma média de 11,352 (±4,660). Os resultados preliminares demonstraram que tanto a amplitude da resposta motora nos três músculos estudados como o split-hand index diminuem com a idade em ambos os sexos, no entanto decorrem análises mais detalhadas cujos resultados pendentes serão apresentados mais tarde.

Conclusões: Existe uma diminuição do split-hand index com a idade em indivíduos saudáveis de ambos os sexos, pelo que o fenómeno de split-hand poderá ser um fenómeno fisiológico associado ao envelhecimento. A identificação deste fenómeno na ELA poderá dever-se a uma propensão para a perda mais rápida dos segundos neurónios associados a estes músculos.

Key-Words: split-hand index, ageing, amyotrophic lateral sclerosis

Abstract:

Background: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a rapidly progressive neurodegenerative disease in which there is loss of both the upper and lower motor neurons. The diagnosis of ALS relies on the identification of suggestive clinical signs, evidence of disease progression, and typical neurophysiological changes. It is well known that hand muscles atrophy is an early clinical feature of ALS. In the intrinsic hand muscles, wasting predominantly affects the lateral (thenar) aspect of the hand involving both median innervated muscles (abductor pollicis brevis (APB) and opponens pollicis) and ulnar innervated muscles (first dorsal interosseous (FDI), adductor pollicis and flexor pollicis brevis), with relative preservation of the hypothenar muscles (abductor digiti minimi (ADM)). The mechanisms underlying the development of this specific wasting pattern in ALS are complex and remain to be elucidated.

Objectives: To determine if split-hand is a physiological phenomenon associated with aging.

Methods: Retrospective study of motor amplitude of the APB, FDI and ADM muscles, and the split index calculation. A sample of 244 patients, referred by suspicion of ocular myasthenia gravis, without neuromuscular disorders, and in whom ocular symptoms were associated with other disturbances, was included. An evaluation of the variation in the amplitude of the motor responses was made, according to sex and age, in order to understand whether age is an independent predictor of the decline in the split-hand index. Statistical analysis was performed using measures of central tendency and dispersion.

Results: Of the 244 individuals, the mean age was 57.8 (± 17.9) years and 126 (51.6%) were men. In the evaluation of the amplitude of the motor response, the APB mean was 7.793 (± 2.378), the FDI mean was 11.886 (± 2.859) and the ADM mean was 8.390 (± 1.928). The split-hand index mean was 11.352 (± 4.660). The preliminary results showed that both amplitude of the motor response in the three muscles studied and the split-hand index decrease with age, in both sexes, however more detailed analysis are being carried out whose pending results will be presented later.

Conclusions: There is a decrease in split-hand index with age in healthy individuals of both sexes, so the split-hand phenomenon may be a physiological phenomenon associated with aging. The identification of this phenomenon in ALS may be due to a propensity of more rapid loss of the lower motor neurons associated with the affected muscles.

**Alunos** | Students: Duarte Siquenique, Joana Barroso

**Tutores** | Tutors: Rodrigo Roquette, António Gonçalves Ferreira

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Anatomia

**E-mail:** duarte.siquenique@campus.ul.pt; joana.barroso@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC/15**

**Título: Mapeamento dos Recetores da Acetilcolina no Tubo Digestivo: Estudo comparativo do feto e do adulto**

Title: Mapping Acetylcholine receptors in the gastrointestinal tract: comparative study of the fetus and the adult

**Palavras-Chave:** Acetilcolina, Trato Gastrointestinal, Feto

**Resumo:**

Fundamento: A dismotilidade gastrointestinal é uma patologia que acarreta importantes consequências e desafios na população pediátrica. No período neonatal um dos principais obstáculos é o controlo da intolerância alimentar, que muitas vezes se manifesta por vómitos e/ou diarreia. Para o controlo destas situações são muitas vezes utilizados fármacos com propriedades pró-cinéticas.

A cinética do trato gastrointestinal depende da ação de neurotransmissores (como dopamina e 5-HT) e hormonas (como motilina, gastrina, entre outros). Os agentes pró-cinéticos atuam então de uma forma similar a estas moléculas, podendo classificar-se em 4 categorias: agentes colinérgicos, antagonistas dopaminérgicos , agonista 5-HT4 ou agonistas de recetores da motilina.

Em relação à acetilcolina é conhecido o seu efeito no trato GI de aumento do tónus e aumento da amplitude da contração e da atividade peristáltica. Sabe-se também que nos espaços sinápticos das transmissões colinérgicas existe uma enzima que hidrolisa a acetilcolina, a acetilcolina esterase (AChE). Em determinadas doenças do TGI, como a doença de Hirschsprung, em que existe um défice de fibras nervosas no tubo digestivo terminal, verifica-se um aumento da actividade da AChE. No entanto, não está exactamente definida a actividade basal da AChE consoante a faixa etária, que pode dificultar a interpretação de resultados.

Objetivos: Mapear a distribuição do receptor muscarínico M2 no tubo digestivo, incluindo todos os segmentos esfincterianos; Mapear a distribuição da acetilcolinesterase (AChE) no tubo digestivo, incluindo todos os segmentos esfincterianos; Criar um mapa funcional dos diversos segmentos anatómicos do tubo digestivo com base na distribuição dos recetores M2 e AChE; Comparar os resultados do mapeamento gastrointestinal de cadáver adulto com os de cadáver fetal.

Métodos: Obtenção e preparação de amostras do TGI completo de cadáver adulto e cadáver fetal. Processamento das amostras para estudo histopatológico (H&E)

Resultados e plano de estudos futuros para concluir o projeto: Devido à evolução da pandemia COVID19, o projeto "MAPEAMENTO DOS RECEPTORES DA ACETILCOLINA NO TUBO DIGESTIVO: Estudo comparativo do feto e do adulto" foi prorrogado ao ano civil de 2021.

Conclusões: Com este estudo pretende-se mapear a distribuição do receptor muscarínico M2 e da acetilcolinesterase no tubo gastrointestinal do humano adulto e fetal, com o objetivo de criar uma mapa dos vários segmentos anatómicos do TGI em função da ação da acetilcolina na motilidade intestinal. Pretende-se que isto traduza uma reorganização funcional dos segmentos anatómicos conhecidos de tal forma que possam ter relevo a nível terapêutico e cirúrgico.

Key-Words: Acetylcholine, Gastrointestinal Tract, Fetus

Abstract:

Background: Gastrointestinal dysmotility is a concerning disorder with many challenges in the pediatric population. In the neonatal period, one of the major issues is food intolerance, which manifests itself as vomiting and/or diarrhea. Management of these situations often requires prokinetic agents.

Gastrointestinal tract kinetic depends largely on the action of neurotransmitters (such as dopamine and 5-HT) and hormones (such as motilin, gastrin, amongst others). Prokinetic agents act in a similar fashion to these endogenous molecules and they may be classified in 4 categories: cholinergic agonists, dopaminergic antagonists, 5-HT4 agonists or motilin agonists.

Concerning acetylcholine, its effect is recognized in the GI tract as an increase in tone, in contractions amplitude and in peristaltic activity. It is known that in the cholinergic synaptic spaces, there is an enzyme which hydrolyses acetylcholine, Acetylcholinesterase (AChE). In certain GI tract diseases, such as Hirschsprung's, where there is a deficit of nervous fibers in the terminal digestive tract, an increased activity of AChE is recognized. Nevertheless, the basal AChE activity is not well characterized, which might hinder interpretation of the results.

Objectives: GIT mapping of M2 muscarinic receptor distribution, including sphincters; GIT mapping of AChE distribution, including sphincters; Functional mapping of the diverse GIT anatomic segments based on M2 receptors and AChE distribution; Comparison of the GIT mapping between adult and fetal cadavers.

Methods: Complete GIT sampling of an adult and a fetal cadaver. Sample processing for histopathologic (H&E)

Results and plan of the future studies required to execute the project: Due to COVID19 pandemic evolution, the project "MAPPING ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN THE GASTROINTESTINAL TRACT: Comparative study of the fetus and the adult" was extended through 2021.

Conclusions: With this methodology, we hope to map the distribution of AChE and the M2 receptors in the human adult and fetus. Our goal is to create a map of the various anatomical segments of the GI tract according to the Acetylcholine activity. It is intended that a better functional knowledge of this distribution will have an impact on therapeutic and surgical action.

**Alunos** | Students: Laura Sofia Calado Gomes

**Projecto** | Project **PEC/18**

**Tutores** | Tutors: Maria Eduarda Neves, Lia Neto

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Anatomia

**E-mail:**

**Título: Plastinização de secções de encéfalo humano: criação de um Atlas anatomo-imagiológico aplicável ao ensino**

Title: Plastination of sections of the human brain: creation of an anatomic and imagiologic Atlas applicable to teaching

**Palavras-Chave:** Plastinização; Neuroanatomia; Ensino.

**Resumo:**

Fundamento: O ensino da Anatomia e da Neuroanatomia tem mudado ao longo dos anos. A técnica de disseção e as lições práticas com cadáveres têm vindo a ser substituídas por aulas teóricas e/ou teórico-práticas.

Esta reestruturação do ensino deve-se a vários fatores tais como o contínuo aumento do rácio aluno/tutor e a escassez de cadáveres doados e órgãos disponíveis para a prática pedagógica.

Torna-se necessário complementar o ensino clássico da Neuroanatomia com o desenvolvimento de métodos mais modernos de ensino sem prejudicar o rigor didático e a aprendizagem dos estudantes.

A plastinização é uma técnica de preservação de peças anatómicas bem estabelecida, cujo princípio é a criação de modelos através de um processo de fixação, desidratação, impregnação e endurecimento a partir de tecido biológico. É superior a outras técnicas de preservação, como a parafina e os modelos em formol, devido à sua maior durabilidade e menor distorção de estruturas.

Objetivos: Criação de modelos de cortes sagitais do encéfalo; Construção, a partir de material biológico plastinizado, de um atlas seccional sagital do encéfalo humano, com imagens correspondentes de Ressonância Magnética; Expansão do acervo disponível no Instituto de Anatomia e aplicação do atlas criado nas aulas práticas de Neuroanatomia da FMUL.

Metodologia: O projecto é composto por 5 fases principais:

Fixação, preparação dos encéfalos e corte seccional: Fixação parcial em formaldeído a 8%; Lavagem em água corrente por várias horas; Remoção da aracóia/pia-máter e vasos superficiais; Cortes de secções de 6 mm em lâmina húmida em planos sagitais; Referenciação, numeração e registo fotográfico.

Desidratação das secções obtidas: Desidratação controlada em acetona a -25ºC durante cerca de 45 dias

Impregnação sob vácuo e endurecimento: Impregnação forçada sob vácuo em câmara fria com preparação de polímero BIODUR P40 e BIODUR A4; Pressão ajustada de acordo com a formação de bolhas até 2mmHg durante 4 semanas; Construção de câmaras de vidro planas para inclusão das secções de encéfalo; Preenchimento da câmara com BIODUR P40/BIODUR A4; Endurecimento sob fonte de luz UV durante 24h

Elaboração do atlas – Forma e legendagem: Corte das arestas com serra de acrílico; Perfuração das margens; Numeração das estruturas em folha de acetato; Sobreposição da página com imagem correspondente de RM-CE; Legendagem em folha anexa

Resultados: Através da realização deste projeto, obtiveram-se placas secas, duráveis, não tóxicas e sem cheiro, que podem ser manuseáveis sem condições especiais de assepsia, de secções de encéfalo humano passíveis a serem integradas no ensino da Neuroanatomia da FMUL.

Conclusões: Através da técnica de plastinização é possível obter modelos anatómicos de boa qualidade, capazes de serem integrados no ensino, de modo complementar ao ensino clássico de Neuroanatomia.

Key-Words: Plastination; Neuroanatomy; Teaching.

**Abstract:**

Background: The teaching of Anatomy and Neuroanatomy has changed over the years. Dissection techniques and practical lessons with cadavers have been replaced by theoretical and/or theoretical-practical classes.

This change in teaching is due to several factors such as the continuous increase in the student/tutor ratio and the scarcity of donated corpses and organs available.

It is necessary to complement the classic teaching of Neuroanatomy with the development of more modern teaching methods without prejudice to the didactic rigor and the students' learning.

Plastination is a well-established anatomical preservation technique, whose principle is the creation of anatomic models through a process of fixation, dehydration, impregnation and hardening of biological tissue. It is superior to other preservation techniques, such as paraffin and formaldehyde models, due to its greater durability and lesser distortion of structures.

Objectives: Creation of models of sagittal sections of the brain; Construction, from plastinated biological material, of a sagittal sectional atlas of the human brain, with corresponding Magnetic Resonance Images; Expansion of the collection available at the Institute of Anatomy and application of the atlas created in the practical classes of Neuroanatomy at FMUL.

Methods: The project consists of 5 main phases:

Fixation, brain preparation and sectional cut: Partial fixation in 8% formaldehyde; Washing in running water for several hours; Removal of the arachnoid/pia mater and superficial vessels; 6 mm section cuts on wet top-bottom blade; Labelling, numbering and photographic record

Dehydration of the obtained sections: Controlled dehydration in acetone at -25ºC for about 45 days

Vacuum impregnation and hardening: Forced vacuum impregnation in a cold chamber with BIODUR P40 and BIODUR A4 polymer preparation; Pressure adjusted to bubble formation up to 2mmHg for 4 weeks; Construction of flat glass chambers to include brain sections; Filling the chamber with BIODUR P40 / BIODUR A4; Hardening under UV light for 24 hours

Atlas elaboration - Form and subtitling: Cutting the edges with an acrylic saw; Perforation of the margins; Numbering of structures on an acetate sheet; Page overlay with corresponding RM-CE image; Subtitling on an attached sheet

Results: Through the realization of this project, dry, durable, non-toxic and odorless plaques were obtained, which can be handled without special asepsis conditions, from sections of the human brain that can be integrated into the teaching of Neuroanatomy at FMUL.

Conclusions: Through the technique of plastination it is possible to obtain anatomical models of good quality, capable of being integrated in teaching, in a complementary way to the classic teaching of Neuroanatomy.

**Alunos** | Students: Miguel Brito Lança, Ricardo Costa Gertrudes, Susana Rebocho Duarte

**Tutores** | Tutors: António Gonçalves Ferreira, Lia Lucas Neto, Pedro Batista, David Berhanu

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Anatomia

**E-mail:** miguellanca@campus.ul.pt | ricardoacgertrudes@campus.ul.pt | susanairduarte@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC/20**

# Título: Mapeamento Anatómico do Núcleo Basal de Meynert

Title: Anatomical mapping of the Nucleus Basalis of Meynert

**Palavras-Chave:** núcleo basal de Meynert, retração com parafina, mapeamento anatómico

## Resumo:

**Fundamento**: O Núcleo Basal de Meynert (nbM) é o principal ponto de partida das vias colinérgicas encefálicas, estando envolvido na memória e na fisiopatologia da demência. A Estimulação Cerebral Profunda (DBS) do nbM tem-se mostrado promissora no controlo de síndromes demenciais. É, no entanto, necessário um mapeamento anatómico preciso para otimizar o alvo e maximizar a eficácia cirúrgica. A técnica de fixação em parafina é uma forma simples de obter cortes para estudos anatómicos, mas está associada a retrações do tecido de 30-50%, constituindo uma limitação para estudos estereotáxicos. Uma técnica de parafina modificada poderá resultar em menores valores de retração, permitindo um mapeamento anatómico tridimensional mais preciso.

**Objetivos:** Mapeamento anatómico do nbM; Avaliação da retração do tecido encefálico com técnica modificada de fixação em parafina.

**Métodos:** Um bloco contendo o nbM foi dissecado a partir de um cérebro adulto. Foram colocadas três agulhas transfixivas de referência, medindo-se a distância inter-agulhas. Após inclusão em parafina procedeu-se ao corte do bloco num criomicrótomo, no sentido antero-posterior e perpendicularmente à linha média. Foram realizadas novas medições da distância inter-agulhas nas várias lâminas. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) ou violeta de cresil e alguns marcados com acetilcolinesterase (AchE), procedendo-se a nova medição da distância inter-agulhas. O cálculo da retração do tecido foi efetuado comparando a distância inter-agulhas a fresco com a distância após inclusão em parafina. O mesmo foi realizado para avaliar a retração após as diferentes colorações. Finalmente, foram obtidas as coordenadas tridimensionais em relação à comissura branca anterior (CBA) e calculadas as dimensões do núcleo, utilizando as lâminas coradas com violeta de cresil.

**Resultados:** A média da retração em parafina foi de 3,40%. Verificou-se uma retração adicional de 1,13% após o processo de coloração com o violeta de cresil e de 3,20% com a H&E. No que diz respeito às dimensões, o núcleo apresentava, aproximadamente, 2119 µm de altura, 5024 µm de largura e 10900 µm de comprimento. Foram obtidas as coordenadas tridimensionais do nbM em relação ao centro da CBA ao longo das várias séries. No que diz respeito à distância (µm) em relação à CBA, o limite superior do núcleo variou entre $x$=8500-25500 e $y$=-4250-(-1250); o limite inferior variou entre $x$=85000-25500 e $y$=-6250-(-3250); o limite medial variou entre $x$=5500-25500 e $y$=-5250-(-2250); e o limite lateral entre $x$=10500-26500 e $y$=-5250-(-2250). Todos os limites do núcleo apresentaram uma variação da coordenada $z$ entre -380 e 10520.

**Conclusões:** Os valores de retração de tecido encefálico obtidos foram inferiores aos descritos na literatura, sugerindo que este método modificado de fixação em parafina poderá ser utilizado no mapeamento anatómico e localização do nbM e, possivelmente, de outras estruturas neuroanatómicas. A coloração condicionou um acréscimo da retração, que foi inferior utilizando o violeta de cresil. Foi possível obter as coordenadas e dimensões do nbM, permitindo o seu mapeamento estereotáxico.

Key-Words: nucleus basalis of Meynert, paraffin shrinkage, anatomical mapping

## Abstract:

**Background:** The Nucleus Basalis of Meynert (nbM) is the main source of the brain's cholinergic pathways and is involved with memory and with the pathophysiology of dementia. Deep Brain Stimulation (DBS) has shown promising results regarding dementia syndromes' control. However, a precise anatomical mapping of the nucleus is required to optimize the target and to maximize the surgical efficacy. The paraffin shrinkage method is a simple way of obtaining cuts for anatomical studies, although it is associated with elevated tissue shrinkage (30-50%) and thus being of limited use in stereotaxic studies. New paraffin fixation techniques might result in minor shrinkage values, allowing for a more precise tridimensional anatomical mapping.

**Objectives:** Anatomical mapping of the nbM; To evaluate encephalic tissue shrinkage associated with a modified paraffin fixation method.

**Methods:** One block containing the nbM was dissected from an adult human brain. Three reference transfixed needles were placed, and the inter-needle distances were measured. After inclusion in paraffin, block-cutting series were obtained with a cryomicrotome, in the anterior-posterior direction and perpendicular to the middle line. New measures of the inter-needle distances were taken in the various cuts. The cuts were stained with hematoxylin-eosin (H&E) or cresyl violet and some were marked with acetylcholinesterase (AChE), and new measures of the inter-needle distances were taken. The shrinkage was calculated by comparing the inter-needle distances in the unprocessed block with the inter-needle distances after the paraffin embedding. The same was performed to evaluate the shrinkage after the different stainings. Finally, tridimensional coordinates in reference to the anterior commissure (AC) were obtained and the blocks dimensions were calculated using the cresyl violet stained cuts.

**Results:** The shrinkage average in paraffin was 3,40%. An additional shrinkage of 1,13% after cresyl violet staining and of 3,20% after H&E staining was observed. Regarding the nucleus dimensions, the nucleus had, approximately, a height of 2119 µm, a width of 5024 µm and a length of 10900 µm. Tridimensional coordinates of the nbM, in reference to the AC center, were obtained throughout the several series. Regarding the distance (µm) in reference to the AC, the superior limit of the nucleus varied between $x$=8500-25500 and $y$=-4250-(-1250); the inferior limit varied between $x$=85000-25500 and $y$=-6250-(-3250); the medial limit varied between $x$=5500-25500 and $y$=-5250-(-2250); and the lateral limit between $x$=10500-26500 and $y$=-5250-(-2250). All of the nucleus' limits had a $z$ coordinate that varied between -380 and 10520.

**Conclusions:** The encephalic tissue shrinkage values obtained were inferior to the values described in literature, suggesting that this modified paraffin inclusion method could be used for the anatomical mapping and to locate the nbM and, possibly, other neuroanatomical structures. The staining process resulted in an additional shrinkage, which was inferior when cresyl violet was used. It was possible to obtain the coordinates and dimensions of the nbM, allowing for its stereotaxic mapping.

**Alunos** | Students: João Pedro Cláudio Agapito

**Tutores** | Tutors: Luísa Lopes, Joana Coelho

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Luísa Lopes Lab, iMM-JLA

**E-mail:** joaoagapito@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC/22**

# Título: O papel da dihidrotestosterona e da 5α-redutase na doença de Alzheimer

Title: Dihydrotestosterone and 5α-redutase role in Alzheimer's disease

**Palavras-Chave:** Doença de Alzheimer; Dihidrotestosterona; 5α-redutase

**Resumo:**

Introdução: A doença de Alzheimer (DA) é a doença neurodegenerativa mais comum no mundo. É caracterizada por um declínio cognitivo progressivo e pela acumulação de placas β-amiloides (Aβ) e agregados de proteína Tau hiperfosforilados (Selkoe D. e Lansbury P., 1999). Infelizmente, não existe nenhum tratamento farmacológico disponível que interrompa a progressão da doença.

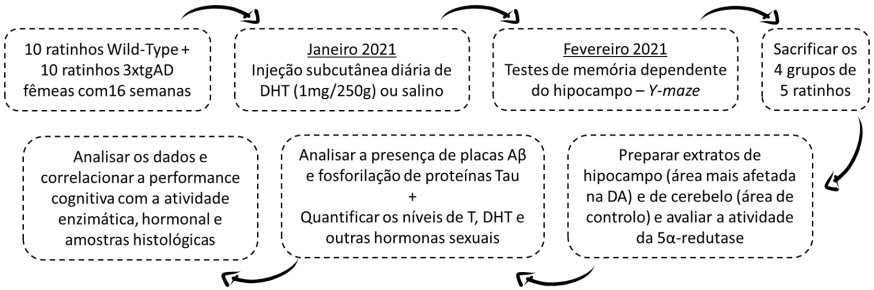
Estudos recentes indicam que o café tem um efeito protetor na DA, no entanto, o mecanismo por detrás deste fenómeno é desconhecido (Kolahdouzan M. e Hamadeh M., 2017). Também se sabe que a cafeína inibe a 5α-redutase, uma enzima que transforma testosterona (T) em dihidrotestosterona (DHT), por isso é de esperar que a sua inibição cause uma acumulação de T e uma diminuição de DHT (Herman A. e Herman A., 2012). Não obstante, pouco se sabe sobre esta enzima a nível cerebral.

A T parece ter um efeito protetor na DA, segundo estudos recentes, contudo, a correlação entre a DA, a atividade da 5α-redutase e os seus efeitos nos níveis de DHT nunca foi explorada.

Talvez estas variações hormonais causadas pela atividade da 5α-redutase afetem o ambiente cerebral a longo prazo. Isto explicaria o efeito neuroprotetor da cafeína, o porquê de 2/3 das pessoas diagnosticadas com demência/ DA serem do sexo feminino e ainda o porquê da maioria dos homens com DA terem níveis de androgénios reduzidos.

Objetivo: Estudar a atividade da 5α-redutase e o efeito da DHT num modelo animal de DA e testar a hipótese de que cafeína modula a atividade enzimática da 5α-redutase com possíveis efeitos na DA. Caso esta enzima tenha um papel importante, isso poderia justificar um dos mecanismos de ação do efeito protetor da cafeína e poder-nos-ia indicar um possível alvo terapêutico para prevenir a DA.

Plano:




Conclusões: Devido à pandemia, tivemos de adiar o início do estudo, mas de acordo com a nossa hipótese, esperamos encontrar uma atividade da 5α-redutase exacerbada, placas Aβ, agregados de proteína Tau hiperfosforilados e ainda desempenho comprometido nos testes comportamentais, tanto nos ratinhos WT tratados com DHT como em todos os transgénicos.

Key-Words: Alzheimer's disease; Dihydrotestosterone; 5α-redutase

Abstract:

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease in the world. It is characterized by progressive cognitive decline and, on a cellular level, by the accumulation of amyloid-β (Aβ) plaques and aggregates of hyperphosphorylated Tau protein (Selkoe D. and Lansbury P., 1999). Unfortunately, there is no pharmacologic treatments available that stop the progression of the disease.

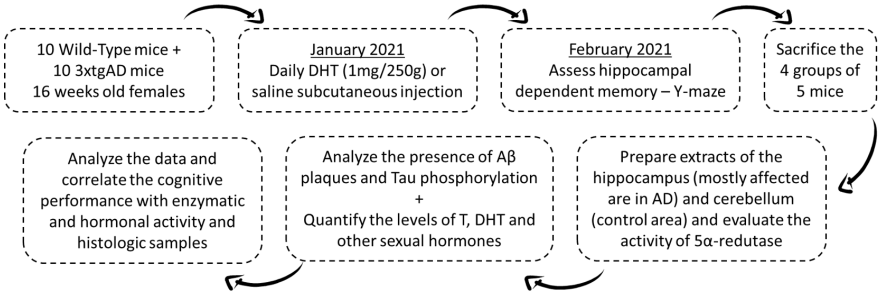
Recent studies imply that coffee has a protective effect on AD. However, the mechanism behind it is not clear (Kolahdouzan M. and Hamadeh M., 2017). It is also known that caffeine inhibits 5α-redutase, an enzyme that transforms testosterone (T) into dihydrotestosterone (DHT), so it is expected that the inhibition of such enzyme promotes the accumulation of T and the decrease of DHT (Herman A. and Herman A., 2012). This enzyme is present in many different tissues, but little is known about its brain influence.

Recent studies demonstrate that T has a protective effect on AD, however, the correlation between AD, the activity of 5α-redutase and its effect on DHT levels was never explored.

Perhaps these hormonal variations caused by the activity of 5α-redutase affect the long-term brain environment. This would explain why caffeine acts like a neuroprotector, why two-thirds of clinically diagnosed cases of dementia/ AD are women and even why most men with AD have lower androgen levels.

Objective: Study 5α-redutase activity and the effect of DHT in a mouse model of AD and test the hypothesis that caffeine modulates the enzymatic activity of 5α-redutase with possible effects on AD. In case this enzyme has an important role, that could justify one of the ways caffeine acts as a neuroprotector and would give us a clinical target to prevent AD.

Plan:




Conclusions: Due to the pandemic, we had to postpone the beginning of the study, but according to our hypothesis we expect to find an exacerbated activity of 5α-redutase, Aβ plaques, aggregates of hyperphosphorylated tau protein and compromised performances on the behavioral tests, both in WT mice treated with DHT and in all transgenic mice.

**Alunos** | Students**:** Maria Teresa Deserto de Oliveira Santana

**Projecto** | Project **BCHULN/24**

**Tutores** | Tutors: Sofia Pereira Coutinho Reimão, Maria Leonor Correia Guedes

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Clínica Universitária de Imagiologia

**E-mail:** mariasantana@campus.ul.pt

# Título: Imagiologia da substância nigra por ressonância magnética na cirurgia de estimulação cerebral profunda: comparação entre registo eletrofisiológico intraoperatório, neuromelanina e FGATIR

Title: Substantia nigra MR imaging in deep brain stimulation: comparison of intraoperative microelectrode electrophysiological mapping with neuromelanin and FGATIR

**Palavras-Chave:** Doença de Parkinson, Cirurgia de estimulação cerebral profunda, Imagiologia da substância nigra por RM

Key-Words: Parkinson's disease, deep brain stimulation, substantia nigra MR imaging

**Resumo:**

Fundamento: A Cirurgia de Estimulação Cerebral Profunda (DBS) é o procedimento cirúrgico *gold standard* no tratamento da Doença de Parkinson (DP) e há evidência crescente a sugerir o uso da substância nigra (SN) como possível alvo. Recentemente, foram desenvolvidas duas sequências de ressonância magnética (RM) particularmente importantes para o estudo da DP: a RM sensível à neuromelanina (NM-MRI), baseada nas propriedades paramagnéticas T1 da neuromelanina, e o *Fast Gray Matter Acquisition T1 Inversion Recovery* (FGATIR), uma técnica que permite uma excelente delineação dos núcleos da base em contraste com a substância branca.

Objetivos: Utilizando novas ferramentas de RM que permitem a visualização *in vivo* da SN, pretende estudar-se os doentes com DP submetidos a DBS, utilizando o FGATIR e a NM-MRI para identificar os limites anatómicos da SN, comparando estes dados imagiológicos com os registos dos microeléctrodos obtidos durante a DBS.

Métodos: *População em estudo*: O estudo incluirá todos os doentes com DP submetidos a DBS do núcleo subtalâmico (STN) no Hospital Universitário de Santa Maria que tenham RM de NM e FGATIR no estudo imagiológico pré-operatório. O diagnóstico de DP foi definido de acordo com os atuais Critérios de Diagnóstico Clínico, tendo sido efetuado por um neurologista especializado em doenças do movimento.

*Protocolo imagiológico, procedimentos cirúrgicos e avaliações intraoperatórias:* Será feito um estudo retrospetivo analisando as RM FGATIR e NM do planeamento estereotáxico pré-operatório (obtidas com uma RM Philips® Achieva 3T) e os registos obtidos durante a DBS dos limites da SN.

As imagens FGATIR e NM serão importadas para o software estereotáxico da Medtronic®, usado para o planeamento cirúrgico de cada doente, previamente fundidas com a tomografia computorizada estereotáxica obtida no dia da cirurgia e integrando o plano final dos elétrodos que foi usado no protocolo cirúrgico.

O limite superior da SN (o corte mais superior onde se visualizava SN) nas imagens de FGATIR e NM foi registado como a distância a partir do alvo da DBS (núcleo subtalâmico) em mm. Toda a análise imagiológica foi feita de forma cega em relação aos registos dos microeléctrodos.

Estas medições imagiológicas serão depois correlacionadas com o ponto de início de atividade elétrica da SN, medido em mm a partir do alvo e obtido intra-operatoriamente por registos qualitativos dos microeléctrodos (MER) para cada elétrodo, durante a DBS, por dois neurologistas experientes. O estudo seguiu os protocolos aprovados e utilizados por rotina, em conformidade com todos os procedimentos éticos.

*Análise estatística:* Far-se-á uma comparação entre o 1) ponto estereotáxico eletrofisiológico de início da atividade elétrica da SN, em mm (segundo os registos intraoperatórios dos microeléctrodos); e 2) o início estereotáxico da SN na NM-MRI (mm), bem como 3) o início estereotáxico da SN no FGATIR (mm) nas trajetórias da sonda utilizadas cirurgicamente.

Plano de estudos futuros para concluir o projeto: Devido às limitações impostas pela pandemia COVID-19, que impediu o acesso aos edifícios do Hospital de Santa Maria, houve um atraso na colheita dos dados, condicionando um adiamento da conclusão do estudo.

Até ao momento, foram recolhidos os dados relativamente aos limites estereotáxicos da SN nas imagens FGATIR. O próximo passo consistirá na análise dos limites estereotáxicos da SN na NM-MRI. Finalmente, analisar-se-ão estes achados imagiológicos, correlacionando-os com os registos intraoperatórios dos microeléctrodos.

Resultados expectáveis: Espera-se obter uma boa correlação entre as imagens FGATIR da SN e os registos dos microeléctrodos dessa estrutura durante a DBS e uma correlação mais fraca com as imagens de NM-MRI.

**Abstract:**

Background: Deep brain stimulation (DBS) is the gold standard surgical procedure for Parkinson's disease (PD) and growing evidence is supporting the substantia nigra (SN) as a possible target. Recently, two specific magnetic resonance imaging (MRI) sequences have been developed that are particularly important for the study of PD: Neuromelanin-sensitive MRI (NM-MRI), based on the paramagnetic T1-shortening properties of neuromelanin, and Fast Gray Matter Acquisition T1 Inversion Recovery (FGATIR), a technique that allows an excellent delineation of the basal ganglia with contrast with the very dark white matter.

Objectives: Using new MRI tools that allow *in vivo* visualization of the SN, we aim to study DBS PD patients using FGATIR and NM-MRI to identify the SN anatomical boundaries, comparing these imaging data with microelectrode recording during DBS.

Methods: *Study population:* The study will include all the PD patients submitted to subthalamic nucleus (STN) DBS at the University Hospital of Santa Maria that have NM and FGATIR MR imaging in the preoperative studies. PD diagnosis was defined according to current Clinical Diagnostic Criteria, made by a neurologist specialist in movement disorders.

*Imaging protocol, surgical procedures and intraoperative assessments:* We will conduct a retrospective study analysing the MRI preoperative stereotactic planning (performed at a Philips® Achieva 3T MRI) FGATIR and NM images and DBS recordings at the SN boundary.

The FGATIR and NM images will be imported to the Medtronic ® stereotactic framework, used for each patient's surgical planning previously merged with stereotactic CT scan obtained on the day of surgery and integrating the final electrodes plan that was used in the surgical procedure. The superior boundary of the SN (the uppermost slice where the SN limit was visible) in the FGATIR and the NM images was registered as the distance from the DBS target (subthalamic nucleus) in mm. All imaging analysis was done blinded to the microelectrode recordings.

These imaging measurements will then be correlated with the point of onset of electric activity of the SN, measured in mm from target, obtained intraoperatively by qualitative microelectrode recordings (MER) during the DBS procedure by two experienced neurologists for each electrode.

The study followed routinely used and approved protocols, in accordance with all ethical procedures.

*Statistical analysis:* We will make a comparison between 1) electrophysiological stereotaxic point of onset of electric activity of the SN, in mm (as per intraoperative microelectrode recordings); and 2) stereotaxic onset of the SN in NM-MRI (mm); as well as 3) stereotaxic onset of the SN in FGATIR (mm) on the followed surgical trajectory of the leads.

Plan of the future studies required to execute the project: Due to the limitations imposed by COVID-19 pandemic, which prevented access to the buildings of Santa Maria University Hospital, we had a severe delay in data collection which forced us to postpone the conclusion of the study.

Thus far, we have collected data regarding the stereotaxic boundary of the SN in FGATIR images. The next step will concern the analysis of the stereotaxic limit of the SN in NM-MRI. Finally, we will analyse these imaging findings and correlate them with the intraoperative microelectrode recordings.

Predictable results: We expect that there will be a good correlation of FGATIR MR images of the SN with the microelectrode recording during DBS and a poorer correlation with NM images.

# Sessão de Posters IV

PAINEL

Afonso Almeida | Angelo Chora* | Bruno Cardoso | Julie Ribot | Patrícia Reis

*A aguardar confirmação

**Alunos** | Students: Sara Mateus Mahomed, Ana Sofia Soares, Tomás Gonçalves

**Tutores** | Tutors: Thomas Hänscheid

**Laboratório, Centro, Unidade**| Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Microbiologia

**E-mail:** smahomed@campus.ul.pt; soares3@campus.ul.pt; tomasgoncalves@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC/11**

**Título: Qual a influência das variações eritrocitárias, em particular na hemoglobina, na capacidade de proliferação do Plasmodium falciparum?**

Title: What is the influence of red blood cells' variations, particularly on haemoglobin, on Plasmodium falciparum proliferation ability?

**Palavras-Chave:** Malária, Plasmodium falciparum, variabilidade na proliferação do P. falciparum

**Resumo:**

Fundamento: A malária é uma doença parasitária causada por parasitas do género *Plasmodium*, dos quais o *P. falciparum* (*P.f.*) é aquele que causa doença mais grave. A gravidade da doença está diretamente relacionada com o número de parasitas no organismo, havendo evidência de que o *P.f.* parece proliferar de forma diferente entre indivíduos. Para além da imunidade, outros fatores podem explicar estas diferenças, tal como o grupo sanguíneo ou a anemia falciforme, embora os mecanismos ainda não estejam completamente esclarecidos.

Objetivos: Este projeto tem como objetivos confirmar a existência de grandes diferenças na proliferação do *P.f.* entre diferentes voluntários, estudar a possibilidade da relação destas diferenças com eventuais alterações eritrocitárias, através da realização de estudos laboratoriais, e estudar a preferência do *P.f.* por eritrócitos de diferentes dadores através da marcação dos eritrócitos e do recurso à técnica de citometria de fluxo.

Métodos: Para tal, pretendia-se recrutar voluntários saudáveis e não imunes para a realização de culturas *in vitro* do parasita. No entanto, devido à pandemia pela COVID-19 o recrutamento de voluntários foi interrompido em março com a suspensão das atividades letivas presenciais da FMUL, tendo sido retomado em outubro com o regresso às atividades presenciais.

Planos futuros: Neste momento, encontramo-nos a realizar culturas *in vitro* do *P.f.* com sangue de cerca de 100 voluntários saudáveis e não imunes ao parasita. Após a análise das parasitemias das culturas, os voluntários que apresentem proliferações do parasita muito altas ou muito baixas serão chamados novamente para nova colheita de sangue para a realização de análises sanguíneas e realização de co-culturas com eritrócitos de diferentes dadores para ser avaliar a diferença de invasão e proliferação do parasita entre dadores.

Resultados: A realização de culturas com sangue de 22 voluntários revelaram uma grande variabilidade da proliferação do parasita entre indivíduos (média: 4.97; mínimo: 0,74; máximo: 11,79). No primeiro quartil, cinco voluntários apresentaram taxas de proliferação baixas com uma média um desvio padrão abaixo da média de todos os voluntários, todos descreveram uma história de anemia ligeira, quer pessoal quer familiar. Mais estudos num destes voluntários revelaram uma heterozigotia para alfa-talassemia.

Conclusão: Com este trabalho espera-se mostrar que o *P.f.* apresenta uma proliferação diferente entre diferentes indivíduos, influenciado por variações ao nível dos eritrócitos.

Key-Words: Malaria, Plasmodium falciparum, P. falciparum intervariability growth

Abstract:

Background: Malaria is a parasitic disease caused by parasites of the genus *Plasmodium*, of which *P. falciparum* (*P.f.*) is the one that causes the most severe disease. The disease severity is directly related to the number of parasites in the body. It seems that *P.f.* has a variable growth between individuals. In addition to immunity, other factors seem to explain these differences, such as blood group or sickle cell anemia, although the mechanisms are not yet completely clear.

Objectives: This project aims to confirm the existence of great differences in the *P.f.* growth between different volunteers, to study the possibility of the relationship of these differences with eventual red blood cell (RBC) variations, through laboratory studies, and to study the preference of *P.f.* for RBC from different donors by marking RBC and using flow cytometry technique.

Methods: To this end, it was intended to recruit healthy and nonimmune volunteers to perform in vitro cultures of the parasite. However, due to the COVID-19 pandemic, the recruitment of volunteers was stopped in March with the suspension of FMUL presential activities and was resumed in October with the return to presential activities.

Future plan: At this moment, we are performing *in vitro* cultures of *P.f.* with blood from about 100 healthy nonimmune volunteers. After the analysis of the parasitemias of the cultures, the volunteers who present very high or very low parasite growth will be called again for a new blood collection to carry out blood analyzes and to carry out co-cultures with RBC from different donors to evaluate the difference on invasion and proliferation of the parasite among donors.

Results: *P.f.* cultures with blood from 22 volunteers showed large inter- variability of the parasite growth (average: 4.97; minimum: 0.77; maximum: 11.79). In the first quartile, five volunteers had low growth rates with an average which fell outside one standard deviation from the average of all volunteers. All of them described a history of mild anemia, either personal or/and in the family. Further studies in one of these volunteers revealed a alpha-thalassemia heterozygosity.

Conclusion: This work is expected to show that *P.f.* has a different growth between different individuals, influenced by variations in RBC.

**Alunos** | Students: Diogo Antunes, José Silva

**Tutores** | Tutors: Filipa Ribeiro, Luís Graça

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Luís Graça Lab, iMM-JLA

**E-mail:** antunesdiogo@campus.ul.pt jose.antonio.silva@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC/12**

**Título: Isolamento de células T foliculares reguladoras a partir de tecido linfoide humano**

Title: Isolation of T folicular regulatory cells from human lymphoid tissue

**Palavras-Chave:** Célula T folicular reguladora, Foxp3, Marcador extracelular

**Resumo:**

Fundamentos: Após interação entre células B e células T foliculares *helper* (Tfh) nos centros germinais (CG) de tecidos linfóides, existe produção de anticorpos de alta afinidade. A produção de anticorpos necessita de ser regulada para evitar autoimunidade. Descobriu-se que as células T foliculares reguladoras (Tfr) são reguladores chave da resposta do CG. Contudo, como as células Tfr são caracterizadas pela expressão de um fator de transcrição intrínseco (Foxp3), não existe nenhum método eficiente para isolar células Tfr a partir de tecido linfoide humano. Assim sendo, existe a necessidade de definir proteínas extracelulares capazes de isolar células Tfr humanas viáveis para estudos funcionais.

Objetivos: Procurámos estabelecer uma estratégia baseada em citometria de fluxo que permita isolar células Tfr a partir de tecido humano linfoide.

Métodos: Para identificar os marcadores extracelulares mais úteis para isolar células Tfr, avaliámos a expressão de 361 diferentes marcadores em células Tfr e células T CXCR5$^+$Foxp3$^-$ a partir de uma amígdala através de citometria de fluxo. Usámos marcação intracelular de Foxp3 como estratégia para identificar células Tfr *bona fide*. Assim, foi possível simular estratégias de *gating*, exclusivamente baseadas em marcadores extracelulares, para avaliar a percentagem de células Tfr Foxp3$^+$ que estariam contidas na *gate*. Adicionalmente, avaliámos o número de células Foxp3$^+$ que não eram incluídas na *gate*, pois alguns marcadores pareciam apenas identificar subtipos de células Tfr. A nossa estratégia identificou sete marcadores de interesse. Uma análise usando várias amostras de amígdala (n=4) foi então realizada para validação.

Resultados: A atual estratégia de *gating* para isolar células Tfr é baseada no CD4, CXCR5, ICOS, CD127 e CD25. Contudo, muitas das células CXCR5$^+$ da amígdala expressam CD25 e algumas células Tfr são CD25$^-$. Consequentemente, apenas 5-15% das células isoladas com esses marcadores são células Tfr Foxp3$^+$. O uso de CD163 e CCR5 permite um enriquecimento de células Tfr até ~40%. Contudo, as células Tfr CCR5$^+$ contêm praticamente todas as células Tfr CD163$^+$. Assim, o CD163 consegue duplicar a pureza do método convencional, sem uma perda significante de subtipos de células Tfr, quando comparado com o CCR5.

Conclusão: Identificámos o CD163 como um marcador extracelular promissor, passível para utilizar em estratégias de isolamentode células Tfr humanas do CG, já que consegue populações isoladas com maior pureza de células Tfr. Estes resultados permitir-nos-ão estudar a biologia e as funções das células Tfr humanas do CG.

Key-Words: T follicular regulatory cell, Foxp3, Extracellular marker

**Abstract:**

Background: High-affinity antibodies are produced following interactions of B cells with T follicular helper (Tfh) cells in germinal centres (GC) within lymphoid tissues. Antibody production needs to be regulated to avoid autoimmunity. It was found that T follicular regulatory (Tfr) cells are key regulators of germinal centre (GC) responses. However, as Tfr cells are characterized by expression of an intracellular transcription factor (Foxp3), there is no efficient method to isolate Tfr cells from human lymphoid tissue. There is, therefore, a need to define extracellular markers able to sort viable human Tfr cells for functional studies.

Objectives: We aimed to establish a flow-cytometry-based sorting strategy allowing the isolation of Tfr cells from human lymphoid tissue.

Methods: To identify the most useful extracellular markers to isolate human Tfr cells, we screened the expression of 361 different proteins in Tfr and CXCR5$^+$Foxp3$^-$ T cells from one tonsil by flow cytometry. We used intracellular staining for Foxp3 as a strategy to identify the *bona fide* Tfr cells. It was then possible to simulate gating strategies, exclusively based on extracellular markers, to assess the percentage of Foxp3$^+$ Tfr cells that would be contained in the gate. Additionally, we assessed the number of Foxp3$^+$ cells that were not included in the gate, as some markers appeared to only identify a subset of Tfr cells. Our strategy led to the identification of 7 candidate markers. A more comprehensive analysis was then performed using several tonsil samples (n=4) for validation.

Results: The current gating strategy to isolate Tfr cells is based on CD4, CXCR5, ICOS, CD127, and CD25. However, many tonsil CXCR5$^+$ cells express CD25 and some Tfr cells are CD25 negative. As a consequence, only 5-15% of cells sorted with those markers are Foxp3$^+$ Tfr cells. The use of CD163 and CCR5 can allow an enrichment of Foxp3$^+$ Tfr cells up to ~40%. However, it appears that CCR5$^+$ Tfr cells contain virtually all CD163$^+$ Tfr cells. Thus, CD163 can reliably double the purity of the conventional methods, without a significant loss of Tfr cell subsets, comparing to CCR5.

Conclusion: We identified CD163 as a promising extracellular marker to use in cell sorting strategies to isolate human GC Tfr, since it provides sorted populations with higher GC Tfr cells purity. These results pave the way to further studies on the biology and function of human GC Tfr cells.

**Alunos** | Students: Pedro Bak-Gordon

**Tutores** | Tutors: Noélia Custódio, Maria Carmo Fonseca

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Carmo-Fonseca Lab, iMM-JLA

**E-mail:** gordonpedro@campus.ul.pt



**Título: Avaliação dos níveis de mRNA como biomarcador de resposta à inibição PARP**

Title: Looking beyond DNA II: Screening for mRNA biomarkers of response to PARP inhibition

**Palavras-Chave:** biomarcador de RNA, cancro do óvario, expressão genética

**Resumo:**

Fundamento: Mutações que atenuam a reparação genómica por recombinação homóloga (RH) promovem a tumorogénese e sensibilizam células cancerígenas a quimioterapia que causam o colapso da forquilha de replicação, um fenótipo conhecido como "BRCAness". No entanto, a resistência aos inibidores da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) é clinicamente importante em pacientes com tumores com mutações nos genes *BRCA*. Além disso, testes genéticos convencionais não detetam qualquer mutação *BRCA* conhecida em mais de dois terços dos pacientes que apresentam tumores com deficiência de RH, e reparação mediada por RH pode estar presente em cancros *BRCA*-mutados. Portanto, as mutações *BRCA*, hereditárias ou somáticas, já não são consideradas um marcador agnóstico de tumor para a suscetibilidade ao tratamento inibidor da PARP.

Objetivos: Avaliar se as alterações adquiridas pelo cancro ao nível do mRNA, como a regulação negativa dos genes *BRCA*, podem ser a base funcional para a deficiência de RH e um biomarcador terapêutico preditivo da suscetibilidade à inibição de PARP. Assim, pretendemos quantificar os níveis de mRNA de *BRCA1/2* em diferentes amostras de cancro do ovário e relacioná-los às mutações genómicas existentes.

Métodos: Extraímos RNA total de amostras de tecido de cancro do ovário FFPE e controlos de trompa de Falópio, previamente rastreadas por métodos convencionais baseados em DNA para a presença de mutações *BRCA*. Desenvolvemos um novo ensaio transcriptomico baseado na tecnologia de PCR digital em *droplets* (ddPCR) que permite a quantificação absoluta e altamente precisa de moléculas de mRNA *BRCA1/2*. Este novo ensaio emprega 3 diferentes sondas fluoroscentes direcionadas a 3 regiões distintas do mRNA longo *BRCA1/2* de modo a cobrir todo o transcrito.

Resultados: Testámos 24 amostras de tumor quanto aos níveis de mRNA de *BRCA1/2*, normalizados para os genes de referência GUSB, POLR1E e NUBP1. Para cada tumor, realizamos três ensaios diferentes para *BRCA1* e outros três ensaios distintos para *BRCA2*. Num subconjunto de amostras de tumor, os níveis diferiram entre as três regiões analisadas. Em análise posterior, selecionámos o ensaio que revelou consistentemente um nível mais alto de mRNA em todos os tumores. Uma comparação entre os valores de expressão relativa de *BRCA1/2* estimados por ddPCR entre amostras de cancro de ovário revelou diferenças generalizadas nos níveis de mRNA de *BRCA1/2*, independentemente das mutações patogênicas do DNA nesses genes.

Conclusões: Coletivamente, estes resultados indicam que o ddPCR é um método robusto e eficiente para quantificar os níveis de mRNA de *BRCA1* e *BRCA2* em amostras clínicas de cancro de ovário. Além disso, os resultados obtidos sugerem que as mutações de DNA por si só não são suficientes para concluir que os níveis de proteínas *BRCA* necessários para o reparo mediado por RH estão alterados em num cancro específico e, portanto, podem não ser um biomarcador confiável para a resposta à inibição de PARP.

Perspectiva (prorrogação): Estamos em processo de estabelecer organóides de cancro de ovário derivados de doentes como modelo de teste farmacológico pré-clínico que será sujeito à inibição de PARP e cuja resposta ao tratamento será correlacionada com os níveis de mRNA de *BRCA1*/2. Prevemos que o nível de expressão dos genes RH, incluindo *BRCA1/2*, seja menor em amostras de tumor correspondentes a organóides responsivos ao tratamento do que em amostras controlo, destacando assim o valor da quantificação de mRNA como um biomarcador preditivo para a resposta ao medicamento.

Key-Words: mRNA biomarker, ovarian cancer, gene expression

Abstract:

Background: Mutations that attenuate HR-mediated repair promote tumorigenesis and sensitize cells to chemotherapeutics that cause replication fork collapse, a phenotype known as "BRCAness". However, resistance to poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors is clinically important in patients with *BRCA*-mutant tumors. Moreover, conventional DNA genetic testing fails to detect any known *BRCA* mutations in over two thirds of patients presenting with HR-deficient tumors, and proficient HR-mediated repair can be present in *BRCA*-mutant tumors. Therefore, *BRCA* mutations, whether germline or somatic, are no longer considered a tumor agnostic marker for susceptibility to PARP inhibitory treatment.

Objectives: Our main goal is to survey whether cancer-gained changes at the mRNA level, such as downregulation of *BRCA* genes, can be the functional basis for HR-deficiency and a therapeutic biomarker predictive of susceptibility to PARP inhibition. To that end, we aim to quantify *BRCA1*/2 mRNA levels in different ovarian cancer samples and relate them to existing genomic mutations.

Methods: We extracted total RNA from FFPE ovarian tissue samples, previously screened by conventional DNA-based methods for the presence of *BRCA* genomic mutations. We further developed a novel transcriptomic assay based on one-step droplet-digital PCR (ddPCR) technology that allows for highly precise, absolute quantification of *BRCA1*/2 mRNA molecules in different ovarian cancer samples. This novel assay employs 3 different fluorescently labeled probes targeted at 3 distinct regions of the long *BRCA1*/2 mRNA so as to cover the whole transcript.

Results: We tested 24 tumor samples for *BRCA1*/2 mRNA levels, normalized to the reference genes *GUSB*, *POLR1E* and *NUBP1*. For each tumor, we performed three different assays for *BRCA1*, and another three distinct assays for *BRCA2*. In a subset of tumor samples, the levels differed among the three regions analyzed. For further analysis, we selected the assay that consistently revealed higher mRNA level across all tumors. A comparison between the relative expression values for *BRCA1/2* estimated by ddPCR between ovarian cancer samples revealed widespread differences in *BRCA1*/2 mRNA levels irrespective of pathogenic DNA mutations in these genes.

Conclusions: Collectively, these results indicate that ddPCR is a reliable method to quantitate levels of *BRCA1* and *BRCA2* mRNA in clinical ovarian cancer samples. Furthermore, the obtained results suggest that DNA mutations alone are not sufficient to conclude whether or not the levels of BRCA proteins necessary for HR-mediated repair are altered in a particular cancer and thus, may not be a reliable biomarker for response to PARP inhibition.

Outlook (prorogation): We are in the process of establishing patient-derived cancer organoids as pre-clinical pharmacological testing model that will be subject to PARP inhibition and whose response to the treatment will be correlated with *BRCA1/2* mRNA levels. We predict the expression level of HR genes, including *BRCA1*/2, to be lower in tumor samples corresponding to treatment-responsive organoids than in control samples, thus highlighting the value of mRNA quantification as a predictive biomarker for drug response.

**Alunos** | Students: João Caroço Fernandes Pedro

**Tutores** | Tutors: Rita Moura, João Eurico Fonseca

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: João Eurico Fonseca Lab,

**E-mail:** jcpedro@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC$_{22}$/03**

**Título: Efeito de subtipos de Células T Foliculares nas respostas imunes das Células B em doentes com Artrite Inicial**

Title: The effect of T follicular cell subsets on B cell immune responses in early arthritis patients

**Palavras-Chave:**

**Resumo:**

Introdução: A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença crónica sistémica autoimune que afeta principalmente as articulações. Se não tratada leva à destruição cartilagínea e óssea. Vários estudos já demonstraram que tanto as Células B como as T são importantes na fisiopatologia da AR. As células B são responsáveis pela formação de autoanticorpos, pela apresentação antigénica e ativação de células T. Trabalhos prévios desenvolvidos no JE Fonseca Lab demonstraram que as alterações nas células B estão presentes desde as primeiras semanas do desenvolvimento da AR. No entanto, os mecanismos responsáveis por estas alterações imunes permanecem desconhecidos. As células Folliculares T Helper (TFH) e Reguladoras (TFR) já foram previamente descritas como cruciais para a produção, diferenciação e sobrevivência de Plasmócitos de alta afinidade específicos de dado antigénio, bem como de Células B de Memória. Estudos recentes demonstraram que respostas alteradas das células TFH e TFR estão associadas com a patogénese de várias doenças autoimunes, incluindo a AR. Ainda assim, o conhecimento sobre a homeostasia das células B, TFH e TFR na AR ainda é escassa. Assim, neste projeto é colocada a hipótese de que as células TFH e TFR contribuem para alterações das respostas imunes das células B, identificadas desde o início da doença.

Objetivos: O objetivo principal deste estudo foi analisar a frequência e fenótipo das células B, TFH e TFR em circulação em doentes com AR inicial não tratados (<1 ano de duração de doença) e doentes com AR estabelecida tratados.

Métodos: Foram recrutados doentes diagnosticados com AR seguidos no Departamento de Reumatologia do Centro Académico de Medicina de Lisboa e comparados com controlos saudáveis. Foram recolhidas amostras de sangue periférico de Controlos Saudáveis (n=7), doentes com AR estabelecida tratados com fármacos antireumáticos modificadores de doença (n=10) e doentes com AR inicial não tratados (n=4). Foram isoladas as células mononucleares periféricas por centrifugação com gradiente de densidade e o fenótipo das células B, TFH e TFR foi analisado por Citometria de Fluxo. As amostras foram processadas com o citómetro de fluxo LSR Fortessa e os dados foram analisados com o software FlowJo. Todas as amostras foram processadas no mesmo dia da sua recolha.

Resultados: A frequência de Células B CD19+ totais foi semelhante entre os dois grupos de doentes e controlos saudáveis. No entanto, doentes com AR inicial apresentaram níveis significativamente diminuídos de Células B de Memória pre-switch (IgD+CD27+) quando comparadas com controlos. Não foram observadas diferenças significativas nas células B naive (IgD+CD27-), Memória post-switch (IgD-CD27+), Duplamente Negativas (IgD-CD27-), de Transição (IgD+CD38++) e Plasmócitos (IgD-CD38+++), entre os grupos de doentes e controlos. Para além disso, a frequência total de Células T (CD3+), células TFH e TFR foi semelhante entre os dois grupos de doentes e controlos saudáveis.

Conclusões: Os doentes com AR inicial não tratada apresentam alterações nas subpopulações de Células B de Memória, não encontradas nos doentes com AR estabelecida, quando comparados com controlos saudáveis. Tanto os doentes com com AR inicial e estabelecida têm frequências semelhantes de células TFH e TFR em circulação, quando comparados com controlos saudáveis. No entanto não se pode excluir um efeito do tratamento nos doentes com AR estabelecida. Estudos futuros com um maior número de doentes e controlos saudáveis são necessários para uma análise estatística mais robusta.

Key-Words: B cells, Follicular T cells, Rheumatoid Arthritis

Abstract:

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic immune-mediated disease that mainly affects the joints. If not properly treated, RA can lead to bone and cartilage destruction. Several studies have demonstrated that both B and T cells are important players in the pathophysiology of RA. B cells are responsible for autoantibody production, antigen presentation and T cell activation. Previous work developed at João Eurico Fonseca Lab have demonstrated that B cell disturbances are present since the first weeks of RA development. However, the mechanisms responsible for these immune alterations remain unclear. Follicular T helper cells (TFH) and follicular T regulatory cells (TFR) have been described as crucial to the production, differentiation and survival of high affinity antigen-specific plasma and memory B-cells. Recent studies have demonstrated that impaired TFH and TFR responses are associated with the pathogenesis of several autoimmune diseases, including RA. Nonetheless, the knowledge about the immune homeostasis of B, TFH and TFR cells in RA is still scarce. Thus, in this project it is hypothesized that TFH and/or TFR cells are implicated on the observed alterations in B cell immune responses since early arthritis onset.

Objectives: The main goal of this study was to analyze the frequency and the phenotype of B, TFH and TFR cell subsets in circulation in untreated early (<1 year of disease duration) and established treated RA patients.

Methods: Patients diagnosed with RA followed up at the Rheumatology Department, Lisbon Academic Medical Centre were recruited and compared to age and sex matched healthy individuals. Blood samples were collected from healthy controls (n=7), established RA patients treated with disease modifying anti-rheumatic drugs (n=10) and untreated early RA patients with <1 year of disease duration (n=4). Peripheral blood mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation and the phenotype of B, TFH and TFR cells was analysed by flow cytometry. Samples were acquired with LSR Fortessa flow cytometer and data was analysed with FlowJo software. All samples were processed and acquired on the same day of blood collection.

Results: The frequency of total CD19+ B cells was similar between both groups of patients and healthy controls. Nevertheless, early RA patients had significantly decreased levels of pre-switch memory B cells (IgD+CD27+) when compared to controls. No significant differences were observed in naïve (IgD+CD27-), post-switch memory (IgD-CD27+), double negative (IgD-CD27-), transitional (IgD+CD38++) B cells and plasmablasts (IgD-CD38+++) between patients and controls. Moreover, the frequency of total CD3+ T cells, TFH cells and TFR cells was similar between both groups of patients and healthy controls.

Conclusions: Alterations in B cell memory subpopulations are found in untreated early RA, but not in established treated RA patients when compared to healthy individuals. Both early and established RA patients have similar frequencies of TFH and TFR cells in circulation when compared to healthy controls. Of note, a treatment effect in established RA patients cannot be excluded. Future studies with a higher number of patients and healthy individuals included are necessary for a more robust statistical analysis.

**Alunos** | Students: José Guilherme Nobre, Maria Beatriz Almeida Santos, João Pedro Marques

**Tutores** | Tutors: Rita Aguiar Moura, João Eurico Fonseca

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: JE Fonseca Lab, iMM-JLA

**E-mail:** joseguilhermenobre@campus.ul.pt; mariabeatrizs@campus.ul.pt; jpmarques@campus.ul.pt

**Projecto** | Project **PEC$_{22}$/16**

**Título: Estudo do perfil de citocinas das células B no sangue periférico na Artrite Idiopática Juvenil**

Title: Study of B cell cytokine profile in peripheral blood in Juvenile Idiopathic Arthritis

**Palavras-Chave:** AIJ, células B, perfil de citocinas

**Resumo:**

A artrite idiopática juvenil (AIJ) é um termo que se refere a um grupo de artropatias crónicas da infância, que consiste num processo inflamatório crónico que afeta a sinóvia e que começa antes dos dezasseis anos de idade, persistindo pelo menos durante seis semanas. O tratamento da AIJ é ajustado de acordo com a gravidade da doença com combinações de anti-inflamatórios e/ ou de drogas antir-reumáticas modificadoras de doença (DMARDs) sintéticas e/ou biológicas. Estudos anteriores demonstraram que as células T CD4+ e CD8+ ativadas se encontram em níveis aumentados não só em circulação, como também no líquido sinovial de doentes com AIJ oligoarticular e poliarticular. Foi também relatado um aumento das c**élulas** B CD5+ e células B de transição (CD24++CD38+++) em doentes com AIJ oligoarticular e poliarticular, o que sugere a ocorrência de defeitos na diferenciação e homeostasia das células B nestas formas da doença. Além disso, a eficácia da terapia de depleção de **células B com rituximab em doentes com formas graves de AI**J oligoarticular, poliarticular e sistémica, refractárias a tratamentos anteriores, reforça que as células B desempenham um importante papel na progressão da AIJ. Recentemente, foi descrito pelo grupo do Prof. João Eurico Fonseca que a maioria dos doentes com AIJ poliarticular (AIJp) e AIJ oligoarticular estendida (AIJoe) preenchem os critérios de diagnósticos para a artrite reumatóide (AR) na idade adulta. No entanto, não é neste momento claro se o padrão de envolvimento de células B na AIJp e na AIJoe segue o que está descrito em adultos com AR. A nossa hipótese é que as células B têm um papel na progressão da AIJp e AIJoe desde a fase inicial da doença, que pode ser afectado pelo tratamento administrado aos doentes, à semelhança do que é observado na AR. O principal objetivo deste projeto é determinar a concentração de citocinas potencialmente relevantes para a ativação de células B no soro de crianças com AIJp e AIJoe quando comparadas com crianças com AIJ oligoarticular persistente (AIJop), AIJ adulta, AR inicial **não tratada e AR** estabelecida tratada. Amostras de sangue serão colhidas a todos os grupos de doentes diagnosticados com AIJ e AR inicial (<1 ano de duração da doença) e estabelecida (>1 ano de duração da doença) e citocinas diretamente relacionadas com a ativação e maturação das células B (*A proliferation-inducing ligand* – APRIL, fator de ativação das células B - BAFF, interleucina (IL)-6, IL-21, CD23 solúvel - sCD23) e a quimiocina CXCL13 serão quantificadas em amostras de soro obtidas de todos os grupos por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e/ ou por *cytokine-bead assay*. Serão incluídos grupos de controlos saudáveis (crianças e adultos) para comparação. Este projecto foi recentemente aprovado pelo GAPIC, por necessidade de superar as dificuldades criadas pela pandemia de COVID-19. Actualmente, amostras de soro de todos os grupos estão a ser colhidas e armazenadas no Biobanco-IMM até serem processadas.

Key-Words: JIA, B cells, Cytokine profile

Abstract:

Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is a term that collectively refers to a group of chronic childhood arthropathies, which consists of a chronic inflammatory process affecting the synovia that begins before the age of sixteen and persists at least six weeks. Treatment of JIA is adjusted according to the severity of the disease as combinations of anti-inflammatory drugs, synthetic and biological disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs). Previous reports have demonstrated that activated CD4+ and CD8+ T cells are found at increased levels not only in circulation, but also in synovium of oligoarticular and polyarticular JIA patients. Expansions of CD5+ B cells and transitional (CD24++CD38++) B cells have been reported in oligoarticular and polyarticular JIA patients, which suggests that defects in B cell differentiation and homeostasis may occur in these forms of the disease. Furthermore, the efficacy of B cell depletion therapy with rituximab in patients with severe forms of oligoarticular, polyarticular and systemic JIA, refractory to several prior agents, also reinforces that B-cells play an important role in JIA progression. Recently, the group of Prof. João Eurico Fonseca has described that the majority of polyarticular JIA (pJIA) and a large fraction of extended oligoarticular JIA (eoJIA) patients fulfill diagnostic criteria for rheumatoid arthritis (RA) in adulthood. Whether the pattern of B cell involvement in pJIA and eoJIA follows what has been described for adults with RA is at this moment unclear. We hypothesize that B cells play a role in early pJIA and eoJIA and that successful treatment intervention is paralleled by correction of B cell disturbances, following the observations obtained in RA. The main goal of this project is to determine the concentration of cytokines potentially relevant for B cell activation in serum from children with eoJIA and pJIA when compared to children with persistent oligoarticular JIA (poJIA), adult JIA, early untreated RA and established treated RA. Blood samples will be collected from all groups of patients diagnosed with early (<1 year of disease duration) and established (>1 year of disease duration) JIA and RA and a group of cytokines directly related with B cell activation and maturation (A proliferation-inducing ligand – APRIL, B cell activating factor – BAFF, interleukin (IL)-6, IL-21, soluble CD23 – sCD23) and the chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (CXCL13) will be quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and/or cytokine-bead assay in serum samples obtained from all groups. Blood samples will also be collected from healthy controls (children and adults) for comparison. This is a new project recently approved by GAPIC, that fulfilled the need to overcome the difficulties created by COVID-19 pandemic. Currently, serum samples are being collected from all groups and stored at Biobanco-IMM until further use.

**Alunos** | Students**:** Leonor Magalhães

**Projecto** | Project **PEC$_{22}$/23**

**Tutores** | Tutors: Hélia Neves

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Histologia e Biologia do Desenvolvimento

**E-mail:** inst.histologia@medicina.ulisboa.pt

**Título: Identificação dos sinais moleculares envolvidos na formação do timo**

Title: Identification of key molecular players in thymus development

**Palavras-Chave:** Assinatura molecular tímica; Sinais reguladores do mesênquima; Perfis Transcricionais

**Resumo:**

O timo é um órgão linfóide primário responsável pela tolerância imunológica central. A origem do rudimento do epitélio tímico (ET) na endoderme da terceira e quarta bolsas faríngeas (3/4BF) foi demonstrada pela primeira vez usando o sistema quimérico galinha-codorniz. Posteriormente, o fator de transcrição Foxn1, foi identificado no ratinho como o marcador de ET mais precoce.

No primeiro ano do projeto (do 22º Programa "Educação pela Ciência"), demonstrámos pela primeira vez, a capacidade da endoderme de BF não-canónicas formarem timo, usando um sistema quimérico galinha-codorniz modificado (*in vitro* e *in ovo*). Em particular, provámos a capacidade da endoderme da 2BF formar timo quando associada à mesoderme da somatopleura (SM; mesênquima não-nativo). Tal sugere que a capacidade natural da endoderme da 2BF originar timo é limitada por sinais inibitórios do microambiente local [porção dorsal (d) do mesênquima do segundo arco faríngeo (2AF); 2FAd)]. De facto, confirmámos a não formação de timo quando a endoderme da 3/4BF (BF canónica) era associada ao mesênquima do 2AFd, revelando assim as propriedades inibitórias deste mesênquima. Neste seguimento, este ano avaliámos a diferenciação de linfócitos T nos timos quiméricos. Utilizando a técnica imunohistoquímica, observou-se a presença de células CD3+ nos timos derivados de associações não-*nature* de tecidos (por exemplo: 2BF+3SM; 2BF+3/4AF; 3/4BF+SM), comprovando a funcionalidade destes órgãos.

Após demonstrarmos que o potencial para "formar timo" está incorporado na endoderme das várias BF, independentemente da sua localização [objetivo 1]; e o papel regulador do mesênquima dos AF na formação do timo [objetivo 2]; o projeto decorre atualmente, com a exploração da assinatura genética conservada do potencial tímico, e a identificação dos sinais moleculares produzidos pelo mesênquima que regulam esse potencial [objetivo 3]. Para isso, serão analisados os perfis de transcriptomas de várias amostras isoladas no estadio de especificação do ET (antes da expressão do marcador do ET, Foxn1).

Para identificar o estadio de desenvolvimento no qual se dá a especificação do ET, foram estudadas as associações *in vitro* da endoderme da 2BF ou 3/4BF com SM. Os tecidos cultivados foram colhidos em tempos experimentais distintos (4h, 9h e 14h de cultura) e o RNA isolado. A expressão de Foxn1 está a ser analisada por qRT-PCR nas amostras referidas.

De futuro, iremos obter os perfis transcricionais da endoderme da BF e do mesênquima do AF, através da sequenciação de RNA e análise bioinformática. Com este projeto, esperamos identificar o programa genético conservado para "fazer um timo" incorporado na endoderme das diferentes BF e os sinais moleculares reguladores fornecidos pelo mesênquima dos AF adjacentes.

Key-Words: Thymic molecular signature; local mesenchymal modulators; transcriptome profiles

Abstract:

The thymus is a primary lymphoid organ responsible for central immune tolerance. The origin of thymic epithelium (TE) rudiment in the endoderm of the third and fourth pharyngeal pouches (3/4PP) was first demonstrated using the chick-quail chimera system. Later, the transcription factor, Foxn1, was identified in mice as the earliest TE marker.

In the first year of this project (of the 22nd "Education for Science" Program), we demonstrated, for the first time, the capacity of the endoderm of noncanonical pouches to form a thymus using a modified chick-quail chimera system (*in vitro* and *in ovo*). Specifically, we showed the capacity of the 2PP endoderm to form a thymus when associated with the somatopleura mesoderm (SM; non-native mesenchyme). This suggests that 2PP endoderm's natural capacity to form thymus is restricted by molecular signals provided by the local environment (the dorsal region of the second pharyngeal arch (PA) mesenchyme; 2PAd). In fact, we also showed that no thymus was formed when the endoderm of the 3/4PP (canonical pouches) was associated with 2PAd, revealing the inhibitory properties of this mesenchyme.

In the present year, we further analysed the capacity of chimeric thymi to support T-cell differentiation. Using the immunohistochemistry approach, we observed the presence of CD3+ cells in thymi derived from the non-*nature* association of tissues (for example 2PP+SM; 2PP+3/4PA; 3/4PP+SM), proving the functionally of those organs.

After showing that PP endoderm embodies the potential to "make a thymus", independently of their specific location [1st aim]; and PA mesenchyme modulates thymus formation [2nd aim]; the project is now focused on exploring the molecular signals responsible for the conserved genetic program(s) that control thymic potential, and cues that render the mesenchyme capable to release or to limit this potential [3rd aim]. For that, the transcriptome profiles of different samples isolated at the stage of TE specification (before the expression of the thymic epithelial marker, Foxn1) will be analysed.

To identify the developmental stage of TE specification, a time-course experiment of the *in vitro* association of tissues (2PP or 3/4 PP endoderm with SM) was performed. Cultured tissues were collected at distinct time-points (4h, 9h, and 14h of culture) and RNA isolated. The expression of Fonx1 is being analysed by quantitative RT-PCR in these samples.

The future work will progress to obtain the PP endoderm and PA mesenchyme transcriptional profiles by RNA sequencing and bioinformatic analysis. With this project, we expect to unravel the conserved genetic program to "make a thymus" conserved in the endoderm of different PP; and to identify the molecular cues provided by the adjacent PA mesenchyme to its regulation.

**Alunos** | Students: Rúben Filipe Alves Simões

**Projecto** | Project **PEC/17**

**Tutores** | Tutors: Vanessa Alexandra Morais

**Laboratório, Centro, Unidade** | Laboratory, Centre, Unit: VMorais Lab, iMM-JLA

**E-mail:** ruben.simoes@campus.ul.pt

**Título: Decifrar o proteoma da mitocôndria sináptica**

Title: Deciphering the protein fingerprint of synaptic mitochondria

**Palavras-Chave:** Mitocôndria, neurónios, sinapse

**Resumo:**

As mitocôndrias são os principais produtores de ATP em células eucarióticas, fornecendo a energia necessária para cada tecido. Locais com maior consumo energético, como neurónios, e, particularmente, as sinapses, dependem mais destes organelos. Embora seja assumido que a maioria das mitocôndrias se replica no corpo celular, resultados recentes têm demonstrado que a biogénese mitocondrial também pode ocorrer em regiões axonais distantes. Contudo, não é ainda compreendido o mecanismo de regulação deste processo. Desenvolvemos uma técnica usando marcação com BrdU ou EdU e análise das imagens obtidas por microscopia para quantificar e localizar replicação de mtDNA em neurónios primários de embriões de ratinho. Os resultados obtidos validam esta técnica como uma forma de avaliar a biogénese mitocondrial. Experiências adicionais serão necessárias para confirmar se a biogénese mitocondrial ocorre longe do corpo celular. Estes dados irão trazer novas perspetivas relativamente à replicação mitocondrial na sinapse, que poderão desvendar novos mecanismos patológicos envolvidos em doenças neurodegenerativas.

Key-Words: Mitochondria, neurons, synapse

Abstract:

Mitochondria are the main ATP sources of eukaryotic cells providing the energy required for each specific tissue. It is known that sites with higher energetic consumption, such as neurons, and particular synapses are more dependent on mitochondria. Although it is assumed that most mitochondria replicate in the cell body, recent reports have showed that mitochondrial biogenesis may also occur in distant axonal regions. However, it is not clearly understood how this process is regulated. We developed a technique using BrdU or EdU labelling and imaging to quantify and localize mtDNA replication in embryonic mice primary neurons. Our findings validate this technique as a read out for mitochondrial biogenesis. Further work is still required to confirm whether mitochondrial biogenesis occurs away from the cell body. These results will give new insights on mitochondrial turnover at the synapse, providing novel pathological mechanisms for neurodegenerative diseases.

# Research Paths

PAINEL

Cláudia Faria, GAPIC, FMUL | Susana Fernandes, GAPIC, FMUL | João Martins, AEFML

# Tiago Gil Oliveira

## *14 years of the Minho MD/PhD program & my path from neuroscience to neuroradiology*

**Tiago Gil Oliveira** is an Assistant Professor at the Neuroscience Department, Life and Health Sciences Research Institute, University of Minho, Portugal, and a Neurorradiologist at the Hospital de Braga, Portugal. He is also the Director of the PhD in Medicine Program at University of Minho and Vice-President of the Portuguese Society for Neuroscience. He was one of the first students to graduate in 2010 from the MD/PhD collaborative program between University of Minho, Thomas Jefferson University and Columbia University. His research work has been focused on the role of lipids in brain physiology and disease. While studying the role of lipid signaling in Alzheimer's disease pathogenesis, he showed that the ablation of the lipid-modulating enzyme, phospholipase D2, was protective in different Alzheimer's disease models. Moreover, using an unbiased lipidomic approach, he showed that specific lipid signaling pathways were altered in a chronic stress model, unraveling new potential therapeutic targets for mood disorders. Currently he is using lipidomic approaches associated with brain imaging to study neurodegenerative diseases.

# Ricardo Fernandes

## *GAPIC Experience*

**Ricardo Fernandes** é Pediatra no Departamento de Pediatria do Hospital de Santa Maria – Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, Professor Auxiliar de Farmacologia Clínica na Faculdade de Medicina Universidade de Lisboa e Investigador na Unidade de Farmacologia Clínica, Instituto de Medicina Molecular.

Iniciou o seu percurso científico através de vários estágios em ciência básica durante o curso de Medicina na FMUL, alguns dos quais apoiados pelo então recém-criado Gabinete de Apoio à Investigação Científica, Tecnológica e Inovação (GAPIC). Mais tarde formou-se em epidemiologia clínica, em particular ensaios clínicos, *outcomes* e revisões sistemáticas, com estágios na Holanda e no Canadá. Doutorado em Pediatria pela FMUL após ter seguido o Programa de Formação Médica Avançada da Fundação Gulbenkian, focou-se na área respiratória pediátrica, com perspetiva metodológica. Atualmente é Project Lead da rede nacional STAND4Kids de ensaios clínicos pediátricos, no âmbito do projeto europeu Conect4children, e Codirector do Cochrane Child Health Field.

**Email**: rmfernandes@campus.ul.pt |**Twitter** @DonDonRic | **Researchgate**: https://www.researchgate.net/profile/Ricardo_ Fernandes4/?ev=hdr_xprf

CENTRO ACADÉMICO DE MEDICINA DE LISBOA

U LISBOA | UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA LISBOA

30 ANOS 1989–2019

GAPIC
Gabinete de Apoio à Investigação Científica, Tecnológica e Inovação

aefml
associação de estudantes da faculdade de medicina de lisboa