U LISBOA | UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA LISBOA

CENTRO ACADÉMICO DE MEDICINA DE LISBOA

DIA DA INVESTIGAÇÃO

DEZ 13

Edifício Egas Moniz
Auditório David Ferreira

2017

GAPIC
Gabinete de Apoio à Investigação Científica, Tecnológica e Inovação

aefml
associação de estudantes da faculdade de medicina de lisboa

Livro de Resumos

- Prémio GAPIC David Ferreira
- 20º PROGRAMA "Educação pela Ciência" / Bolsas CHLN-FMUL
- Research Paths & Research Tools

Apoios:

AIMS MEETING

Corrida Saúde e Solidária

ACTA MÉDICA PORTUGUESA STUDENT

URPC Unidade Relações Públicas e Comunicação

INTRODUÇÃO

O Dia da Investigação é uma iniciativa do GAPIC e da AEFML, de grande sucesso junto dos estudantes de Medicina e dos médicos em início de carreira, para os quais a investigação científica representa uma enorme mais-valia de desenvolvimento pessoal e curricular.

Criado a 11 de Julho de 1989, pelo Professor José David-Ferreira, o GAPIC tem tido como principal finalidade promover a prática da investigação científica entre os estudantes, fomentando a cultura científica dos futuros médicos.

Nesta 6.ª edição do Dia da Investigação os alunos da FMUL apresentam os resultados dos seus projectos desenvolvidos no âmbito do 20.º Programa "Educação pela Ciência" | Bolsas CHLN/FMUL e, simultaneamente, despertam o espírito inquieto de outros alunos de Medicina e de outras áreas das Ciências da Saúde, para a investigação científica. Serão também entregues os Prémios GAPIC David-Ferreira destinados aos melhores Trabalhos Finais /Teses do MIM em 2016-2017, que serão apresentados a toda a comunidade.

O Dia da Investigação é, por isso, o dia que homenageia a actividade científica desenvolvida pelos alunos da FMUL, divulgando os seus trabalhos e estimulando o debate sobre investigação cientifica no seio da comunidade do CAML.

Neste dia juntam-se a este debate prestigiados convidados: a Prof.ª Doutora Alexandra Santos (MRC Clinical Research Fellow at the Department of Paediatric Allergy, da King's College de Londres) que irá participar na sessão Research Paths, com a comunicação "Choosing to be a Clinician Scientist to improve our understanding of food allergy"; e o Frederico Munoz (Chief Architect, IBM Portugal) que irá participar na sessão Research Tools, com a temática "IBM Watson: Big Data, Cognitive Computing and Personalized Medicine".

A Equipa do GAPIC

Mestre Sónia Barroso	Prof.ª Doutora Ana Espada de Sousa	Prof.ª Doutora Cláudia Faria	Prof. Doutor Ricardo Fernandes	Prof.ª Doutora Susana Fernandes
Assessoria	*Coordenadora*	*Vogal*	*Vogal*	*Vogal*

8:30 **Abertura do Secretariado**

9:00 **Open Session**

Prof.ª Doutora Ana Sebastião – Sub-Diretora da FMUL | Prof. Doutor Melo Cristino – Presidente do Conselho Científico | Prof.ª Doutora Carmo Fonseca – Presidente do iMM | Prof.ª Doutora Maria Mota – Diretora Executiva do iMM | Dr.ª Maria Margarida Lucas – Diretora Clínica do CHLN | Teresa Valido – Presidente da AEFML | Prof.ª Doutora Ana Espada de Sousa – Coordenadora do GAPIC

New research platform: "Find the Investigator you are looking for" – Susana M. Fernandes

GAPIC Alumni / PREPIT – Ricardo Fernandes

Entrega doPrémio GAPIC David-Ferreira

Apresentação dos trabalhos Finais/Teses do MIM 2016/17 Premiados

PG/**21** **Quantitative analysis of the single-tumor-cell-lineage dynamics that underpin relapse of acute myelogenous leukemia**
Diogo Maia e Silva

PG/**18** **Unravelling the role of the long noncoding RNA NORAD in breast cancer**
Catarina Alves do Vale

PG/**06** **Trypanosoma brucei distribution in the male reproductive system**
Sílvia Maria de Jesus Pimenta Teixeira da Silva

PG/**02** **Nocebo effect in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis**
Miguel Leal Rato

10:00 **POSTERS SESSIONS | Fruit Break**

20.º Programa "Educação pela Ciência" Bolsas CHLN/FMUL

Poster Session I

Moderadores: Bruno Miranda / Doroteia Silva

05/ PEC **Valor prognóstico do estudo de condução do nervo frénico na esclerosa lateral amiotrófica – uma revisão sistemática e meta-análise**
Cláudia Silva | Instituto de Fisiologia

15/ PEC **Análise de Biomarcadores urinários na doença poliquística renal autossómica dominante**
Beatriz Mestre; Carla Novais | Laboratório de Genética

16/ PEC **Biomarcadores Tubulares para o Diagnóstico Precoce e Prognóstico da Lesão Renal Aguda no Pós-operatório de Cirurgia Cardíaca**
Carolina Freitas; Ana Isabel Madureira | Clínica Universitária de Nefrologia

10/ BCHLN **Envolvimento cardíaco primário na Fibrose Quística. Contributo para o estudo dos mecanismos, padrões clínicos, imagiológicos, disautonómicos e de biomarcadores e o seu impacto prognóstico**
Tiago Gonçalves | Clínica Universitária de Cardiologia

12/ PEC **O valor prognóstico da proteína YB-1 secretada em doentes com cancro da mama**
Ana Rita Bello; José Vicente Rocha | Luís Costa Lab, iMM

28/ PEC **O padrão de prescrição de hipotensores oculares em Portugal e a sua adequação às Normas de Orientação Clínica - PEM Study**
Gonçalo Félix Pimenta | Centro de Estudos das Ciência da Visão

06/ PEC **Doença de Fabry: Qual a importância da aurícula esquerda na deteção precoce de envolvimento cardíaco**
Maria Isabel Silva | Clínica Universitária de Cardiologia

Poster Session II

Moderadores: Sérgio Dias | Vanessa Morais

11/ PEC **Estabilidade ou instabilidade da inativação do cromossoma X em células estaminais induzidas**
Cristiano Esteves | Carmo Fonseca Lab, iMM

25/ PEC **Correção da Depranocitose através de CRISPR**
Beatriz Lopes Draiblate | Carmo Fonseca Lab, iMM

17/ PEC **Estudo do SNP rs2274223 do gene PLCE1 numa população portuguesa de doentes com cancro colorrectal**
José Miguel Frazão | Unidade de Oncobiologia Translacional

23/ PEC **Frequência alélica e plasticidade da mutação RANK R450W em ADN germinal e tumoral de doentes com cancro da mama**
Pedro Miguel Ferreira | Luís Costa Lab, iMM

29/ PEC **Desvendando o papel do RNA longo não codificante NORAD no cancro da mama**
Catarina Alves do Vale | Carmo Fonseca Lab, iMM

07/ PEC **O impacto do PGC-1α e metabolismo mitocondrial em cancro de mama com fenótipo agressivo induzido por hipercolestrolemia**
Inês Alexandre | Sérgio Dias Lab, iMM

09/ PEC **Definição de um padrão de expressão de microRNAs específico de T-ALL**
Tatiana Duque | João Barata Lab, iMM

Poster Session III

Moderadores: Karine Serre | Rita Fragoso

03/ PEC **Evolução do perfil de mediadores inflamatórios em recém-nascidos com encefalopatia hipóxico-isquémica tratados com hipotermia induzida**
Beatriz Vieira de Sá | Bruno Silva Santos Lab, iMM

13/ PEC **Controlo de dano pulmonar pelas células T γδ**
Gonçalo Palmeirim | Bruno Silva Santos Lab, iMM

14 e 18/ PEC **O impacto da inflamação crónica na regeneração da medula espinhal**
Ana Filipa Pereira; Ana Paula Martins | Leonor Saúde Lab

19/ PEC **Das Células Dendríticas aos Linfócitos: Novos Protagonistas na Esofagite Eosinofílica?**
Alexandre Vasques | Clínica Universitária de Pediatria

24/ PEC **The functional effects of the extracellular form of the Heat-Shock Protein 90 on macrophage activation in ovarian cancer cells**
Ana Catarina Relvas | Instituto de Histologia e Biologia do Desenvolvimento

26/ PEC **Criação de modelos vasculares por impressão tridimensional (3D)**
Mickael Varoujan Bartikian; Angélica Ferreira | Instituto de Anatomia

Poster Session IV

Moderadores: Luísa Lopes | Sofia Reimão

04/ PEC **Estimulação Cerebral Profunda na Distonia**
David Alexandre Prescott | Laboratório Farmacologia Clínica e Terapêutica

Organização

GAPIC – Gabinete de Apoio à Investigação Científica, Tecnológica e Inovação

AEFML – Associação de Estudantes da Faculdade de Medicina de Lisboa

Apoios:

AIMS MEF PNF

Corrida Saúde e Solidária

ACTA MÉDICA PORTUGUESA STUDENT

URPC – Unidade Relações Públicas e Comunicação

08/ PEC **Mapeamento dos Receptores Dopaminérgicos no Tubo Digestivo. Estudo comparativo do feto e do adulto.**
João Simões; Sara Moreira; Duarte Vinha | Instituto de Anatomia

20/ PEC **Estudo da Vascularização do Sistema Nervoso Autónomo Simpático Cervical no Cadáver Humano**
Ana Carolina Almeida; Margarida Isabel Pascoal; Miguel de Oliveira Carvalho | Instituto de Anatomia

22/ PEC **Estudo da Vascularização dos Nervos Mediano e Cubital no Cadáver Humano - Importância na utilização de retalhos livres de nervos periféricos.**
Aldara Faria; Maria Eduarda Neves | Instituto de Anatomia

02/ BCHLN **Efeitos a curto e médio prazo da estimulação cerebral profunda do núcleo sub-talâmico nos sintomas disautonómicos da doença de Parkinson**
Filipe Wolff Fernandes | Unidade de Farmacologia Clínica

OPI **Estudo exploratório acerca dos efeitos da KTP e KTP-NH2 na função sináptica**
Sara Botelho Rosa | Instituto de Bioquímica

21/ PEC **Bases Anatómicas da Metastização Neuronal de Adenocarcinoma da Mama para o Plexo Braquial**
Ana Catarina Correia; David Gonçalves Paixão | Instituto de Anatomia

01/ BCHLN **Validação do score FABS para o diagnóstico de" falsos AVCs" no serviço de urgência numa coorte de pacientes portugueses**
Mariana Alves Vargas | Clínica Universitária de Neurologia

POSTER SESSION - Prémio GAPIC David-Ferreira

Trabalhos Finais / Teses do MIM 2016/17 selecionados pelo júri para apresentação como poster

Moderadores: João Ferreira

PG/04 **Cortical-Amygdala Volumetric Ratios Predict Onset of Symptoms of Psychosis in 22q11.2 Deletion Syndrome**
David Alves Berhanu

PG/05 **Diagnostic workup and etiologic diagnosis of ischemic stroke in young adults: a retrospective two-center comparison**
Bernardo Crespo Pimentel

PG/07 **Deep Brain Stimulation in Dystonia**
David Alexandre Prescott

PG/14 **Study of myocardial deformation with feature tracking cardiovascular magnetic resonance in patients with hypertrophic cardiomyopathy**
Catarina Martins O'Neill

PG/16 **Synchronous carotid and cardiac surgery: a low risk procedure in high-risk patients**
Pedro Meireles

PG/22 **Astrocitoma Pilocítico em Idade Pediátrica – Um Estudo Retrospetivo**
Ricardo Domingos Grilo

11:30 **RESEARCH PATHS**
Moderadores: Cláudia Faria (GAPIC); Barbára Saraiva (AEFML)

Choosing to be a Clinician Scientist to improve our understanding of food allergy
Alexandra Santos – Senior Clinical Lecturer & MRC Clinician Scientist, King's College London

12:30 ***Healthy Lunch***

13:30 **RESEARCH TOOLS**
Moderadores: Ricardo Fernandes (GAPIC) | Lourenço Saldanha (AEFML)

IBM Watson: Big Data, Cognitive Computing and Personalized Medicine
Frederico Munoz – Chief Arquitect, IBM Portugal

Round Table with Carmo Fonseca and Ruy Ribeiro

15:00 ***Coffee-Break***

15:15 **ORAL COMMUNICATIONS**
20.º Programa "Educação pela Ciência" | Bolsas CHLN/FMUL
Moderadores: Karine-Serre | Luís Graça | Luísa Lopes | Rita Fragoso

17:15 ***Tea-Break***

17:30 **SESSÃO AEFML**

Science and Innovation: Taking the first steps

18:00 **AWARDS AND CLOSING SESSION**

Legenda:
| BCHLN – Bolsa CHLN/FMUL | OPI – Opção Projeto de Investigação
| PEC – Programa "Educação pela Ciência" | PG – Prémio GAPIC David-Ferreira

Participações:
AIMS | Biobanco | iMM | Biblioteca da FMUL | Centro de Investigação Clínica do CAML | Departamento de Educação Médica da FMUL | Instituto de Formação Avançada da FMUL | Instituto de Medicina Molecular

Posters:
GAPIC – Prémio David Ferreira 2017-2018
GAPIC – 2017 Projects: 21.º Programa "Educação pela Ciência" | Bolsas CHLN/FMUL
GAPIC – 2017 Projects: 14.ª Bolsa de Investigação Fundação AstraZeneca/FMUL
GAPIC – Launch the GAPIC ALUMNI

U LISBOA | UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA LISBOA
CENTRO ACADÉMICO DE MEDICINA DE LISBOA

DIA DA INVESTIGAÇÃO

DEZ 13
Edifício Egas Moniz
Auditório David Ferreira
2017

Programa
Detalhado

- **Prémio GAPIC David Ferreira**
- **20ºPROGRAMA "Educação pela Ciência" / Bolsas CHLN-FMUL**
- **Research Paths & Research Tools**

www.medicina.ulisboa.pt/diainvestigacao

PRÉMIO **GAPIC**

David Ferreira

Trabalhos Premiados
Comunicações Orais

Alunos | **Students:** Diogo Maia e Silva

Tutores | **Tutors:** Haakan Norell & Bruno Silva-Santos

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Silva-Santos Lab

E-mail: maia@cshl.edu

Título: Análise quantitativa da dinâmica de linhagens derivadas de células únicas responsáveis pela recidiva de leucemia mielóide aguda

Title: Quantitative analysis of the single-tumor-cell- lineage dynamics that underpin relapse of acute myelogenous leukemia

Palavras-Chave: Recidiva tumoral; Resistência a terapêutica; Arquitetura tumoral

Cancro refere-se a um grupo heterogéneo de doenças que partilha a proliferação desregulada de uma população clonal de células anómalas. Apesar da sua origem comum, as células tumorais estão organizadas em subpopulações com alterações únicas, ausentes no resto da população (subclones). A heterogeneidade intratumoral é uma barreira para o sucesso dos tratamentos, pois torna cada população de células malignas num mosaico de diferentes alvos terapêuticos, o que facilita a ocorrência de tumores resistentes. É, por isso, da maior importância entender o impacto da heterogeneidade intratumoral na eficácia terapêutica e compreender o efeito das terapias na arquitetura tumoral.

Para responder a estas questões, desenvolvemos um modelo in vitro através do qual analisamos a dinâmica celular da leucemia mielóide aguda (LMA) humana em detalhe. Este método combina o seguimento de linhagens derivadas de células tumorais únicas com comparação directa de réplicas de arquiteturas tumorais. Com base na tecnologia de "códigos de barras celulares", este sistema permite investigar os efeitos de diferentes terapias na dinâmica de linhagens derivadas de células únicas de uma linha celular de LMA ao longo do tempo. Propusemo-nos a investigar a natureza da recidiva de LMA pós-quimioterapia ou novas terapêuticas, para determinar se a recidiva depende de subpopulações tumorais predeterminadas, ou de células seleccionadas estocasticamente.

Tratámos grupos de réplicas de subculturas de LMA com cada um dos regimes terapêuticos e analisámos as arquiteturas de "códigos de barras" das células "recidivantes". Combinações de doxorrubicina e citarabina (quimioterapia), com ou sem o fármaco hipometilante decitabina, eliminaram mais células e linhagens em comparação com doxorrubicina isoladamente. O tratamento com doxorrubicina seleccionou subpopulações marcadamente predeterminadas, enquanto populações mais estocásticas sobreviveram à quimioterapia. A adição de decitabina a qualquer um destes regimes aumentou a estocasticidade da recidiva, diminuindo ao mesmo tempo a quimioresistência consistentemente adquirida com tratamento prévio com doxorrubicina.

O nosso estudo esclarece novos aspectos da dinâmica populacional subjacente à recidiva de LMA e sugere um potencial benefício na combinação de quimioterapia e decitabina.

Key-words: Cancer recurrence; Therapy resistance; Tumor architecture

Cancer is a group of diseases characterized by deregulated proliferation of a clonal population of abnormal cells. Despite their common ancestry, cancer cells organize in subsets with unique alterations not found in the rest of the population (subclones). This intra-tumor heterogeneity is a major hurdle for cancer treatments: it makes each population of malignant cells a mosaic of different biological targets, facilitating the emergence of therapy resistant tumors. It is thus of paramount importance to understand how intra-tumor heterogeneity impacts treatment efficacy and how drugs shape tumor architecture.

To this end, we developed an in vitro model that can dissect the cellular dynamics of human acute myeloid leukemia (AML) in great depth. It leverages the combination of longitudinal single-cell-derived lineage tracing and direct comparison of replicate tumor architectures. Based on "cellular barcoding" technology, this system allows the dissection of the effects of different therapies on the single-cell-lineage dynamics of a human AML cell line over time. We set to investigate the nature of AML relapse following standard and novel therapies, with the aim of determining whether relapse in each case is driven by predetermined tumor subpopulations or rather by stochastically selected subpopulations.

We treated sets of replicate barcoded AML subcultures with each of the regimens and analyzed the barcode architectures of the recurring cells ("relapses"). Doxorubicin plus cytarabine (chemotherapy), with or without the hypomethylating agent decitabine, were more potent regimens regarding cell killing rates and numbers of lineages eliminated, in comparison with doxorubicin with or without decitabine. Doxorubicin selected very predetermined relapsing subpopulations, while the lineages that escaped chemotherapy were more stochastic. The addition of decitabine to either of these regimens increased the stochasticity of their relapses, and negated the chemoresistance-imprinting otherwise consistently mediated by all the doxorubicin-containing treatment regimens.

Overall, our study has provided insight into the population dynamics that underpin AML relapse as well as support for a potential clinical role for the combination of standard chemotherapy with decitabine.

Alunos | **Students:** Catarina Alves do Vale

Tutores | **Tutors:** Bruno Bernardes de Jesus

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Maria Carmo-Fonseca Lab, iMM João Lobo Antunes

E-mail: cvale@campus.ul.pt

Título: Desvendando o papel do RNA não codificante longo NORAD no cancro da mama

Title: Unravelling the role of the long noncoding RNA NORAD in breast cancer

Palavras-Chave: Cancro da mama; RNAs não codificantes longos; NORAD

Fundamento: O Projeto Genoma Humano e avanços posteriores em sequenciação revolucionaram a visão acerca da complexidade do transcriptoma. De facto, apenas ≈2% do genoma codifica proteínas, contrastando com a fracção (>75%) que é activamente transcrita em RNAs não codificantes.

Neste trabalho, procurámos investigar o papel que NORAD – RNA longo não codificante recentemente descrito – desempenha em cancro da mama. Apesar da evidência de que promove a proliferação celular e a estabilidade cromossómica, o seu verdadeiro papel no desenvolvimento tumoral permanece ainda por desvendar.

Objetivos: Explorar o potencial de NORAD na terapia dirigida para cancro da mama é o principal propósito deste projecto, com base em dois objectivos complementares: 1. Testar se a expressão de NORAD é específica de subgrupo e/ou correlacionada com a agressividade tumoral. 2. Avaliar se a diminuição dos níveis de NORAD afecta a sensibilidade de linhas celulares de cancro da mama ao tratamento com o citotóxico doxorrubicina.

Métodos: A expressão de NORAD foi avaliada através de PCR quantitativo em diversas linhas celulares de cancro da mama. A plataforma KM Plotter Online Tool foi utilizada para explorar a correlação entre a expressão de NORAD em amostras tumorais e a evolução clínica dos pacientes.

Foram utilizados oligonucleótidos antisense LNA™ GapmeRs para a downregulation de NORAD. A viabilidade celular foi medida através do ensaio da resazurina, após a downregulation e a incubação com doxorrubicina. A hibridação in situ por fluorescência de molécula única foi efectuada com sondas Stellaris®.

Resultados: A análise dos níveis de NORAD em linhas celulares de cancro da mama mostrou que o subtipo mais agressivo exibia níveis de expressão superiores aos apresentados pelas células mais indolentes e pelas não tumorais. Adicionalmente, observou-se, através da KM Plotter Online Tool, que uma elevada contagem de transcritos NORAD se encontrava associada a menor taxa de sobrevivência livre de recidiva de doença. No entanto, esta correlação era válida unicamente para o subtipo basal.

Desta forma, avaliou-se se os níveis de NORAD poderiam afectar a sensibilidade tumoral à quimioterapia. Resultados preliminares sugerem que a downregulation de NORAD em linhas celulares do subtipo basal/triplo-negativo aumenta a sensibilidade à doxorubicina.

Através de hibridação in situ por fluorescência de molécula única, foi ainda possível visualizar os transcritos NORAD pela primeira vez em linhas celulares de cancro da mama, tendo sido detectada uma distribuição predominantemente citosólica.

Conclusões: O nosso projecto abre caminho para novas investigações referentes ao contributo deste promissor RNA não codificante longo em cancro da mama do subtipo basal. A comprovar-se a sinergia entre a terapêutica com citotóxicos e a downregulation de NORAD, o targeting selectivo de NORAD utilizando estratégias in vivo poderá permitir a redução da dose de fármaco necessária para travar o desenvolvimento tumoral.

Key-words: Breast cancer; long noncoding RNAs; NORAD

Background: The Human Genome Project and posterior improvements in sequencing technology provided transformational insights into the complexity of the transcriptome. Indeed, only approximately 2% of the genome is believed to code for proteins, whereas at least 75% is actively transcribed into noncoding RNAs.

In this study, we aimed to explore the role of the recently described long noncoding RNA NORAD in breast cancer. Notwithstanding the previous evidence that NORAD promotes cell proliferation and chromosomal stability, its true involvement in tumourigenesis remains unclear.

Objectives: The main goal of this project is to explore the potential role of NORAD in the targeted therapy of breast cancer. With focus on two complementary perspectives, our objectives were: 1. To assess whether NORAD expression is subtype-specific and/or correlated with tumor aggressiveness. 2. To evaluate if NORAD downregulation may affect the sensitivity of breast cancer cell lines to doxorubicin - a cytotoxic drug used in the clinical setting.

Methods: NORAD expression was analysed through quantitative PCR in several breast cell lines (tumourigenic and non-tumourigenic). The KM Plotter Online Tool was used to explore the correlation between NORAD expression in tumour samples and patients' clinical outcome.

NORAD downregulation was effectively performed using antisense oligonucleotides LNA™ GapmeRs. After downregulating NORAD and incubating cells with doxorubicin, cellular viability was assessed by performing the resazurin assay. Single-molecule RNA fluorescence in situ hybridization was executed using Stellaris® FISH Probes.

Results: The analysis of NORAD expression in several breast cancer cell lines has shown that the most aggressive subtype exhibited higher NORAD levels, in contrast to the most indolent and non-tumourigenic cell lines, which presented with the lowest levels.

Motivated by the aforementioned in vitro results, we found out, using the KM Plotter Online Tool, that high intratumour NORAD levels were associated to poor relapse-free survival, but exclusively in the basal-like subtype.

Given the correlation between expression levels and survival, we decided to study the effect of combining NORAD inhibition and drugs, topic which had never been addressed before. Preliminary results suggest that NORAD downregulation increases the sensitivity of basal-like/triple-negative breast cells to doxorubicin.

Moreover, in this study, NORAD transcripts were visualized, for the first time, in breast cells by single-molecule fluorescence in situ hybridization, in which a predominantly cytosolic distribution has been detected.

Conclusions: The present investigation paves the way for future work concerning this promising RNA in basal-like breast cancer. If proven to be synergistic with chemotherapy, the selective targeting of NORAD using in vivo downregulation strategies may contribute to reduce the drug dosage required to hinder tumour development.

Alunos | **Students:** Sílvia Maria de Jesus Pimenta Teixeira da Silva

Tutores | **Tutors:** Luísa Figueiredo

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Luísa Figueiredo Lab

E-mail: silviapimenta92@gmail.com

Projeto | **Project**

2017 PG/06

Título: Distribuição de Trypanosomma brucei no sistema reprodutor masculino

Title: Trypanosoma brucei distribution in the male reproductive system

Palavras-Chave:
Tripanossomíase Humana Africana, Sistema reprodutor masculino, Transmissão sexual

Trypanosoma brucei é o microorganismo responsável pela tripanossomíase africana humana, também conhecida como doença do sono. A progressão da doença geralmente começa com uma fase hemolinfática, seguida pela invasão parasitária do sistema nervoso central. Actualmente não existem vacinas disponíveis e existe um conjunto limitado de fármacos para tratar esta doença, muitos deles associados a uma elevada toxicidade. Estudos recentes revelaram a presença de tripanossomas no sistema reprodutor masculino. Ao considerar o desenvolvimento de fármacos anti-tripanossomíase, os órgãos reprodutores são de interesse, uma vez que os parasitas que se infiltram e persistem nas gónadas masculinas poderão estar protegidos dos fármacos pela barreira hemato-testicular. Uma vez que há evidências epidemiológicas da transmissão sexual de T. brucei em seres humanos, perceber como os tripanosomas estão distribuídos no sistema reprodutor masculino também pode ajudar a identificar os caminhos subjacentes à transmissão sexual da doença. Neste projecto caracterizámos a infecção no sistema reprodutor masculino de ratinho utilizando um modelo animal e, através de análises histológicas, identificámos a infiltração do sistema reprodutor masculino por parasitas e células inflamatórias infiltrados numa fase tardia da infecção, especialmente no epidídimo. A quantificação de parasitas, determinada por PCR quantitativo de DNA genómico, confirmou que a carga parasitária aumentou ao longo do tempo. A microscopia eletrónica de transmissão mostrou que, mesmo quando encontrados em maior quantidade, os tripanosomas no epidídimo apresentaram acentuadas alterações morfológicas consistentes com morte celular, possivelmente devido à resposta imune observada numa fase tardia. Em suma, propomos que a infiltração de células inflamatórias poderá comprometer a difusão de fármacos, permitindo que os órgãos reprodutivos atuem como um reservatório de parasitas. Além disso, a distribuição parasitária no epidídimo poderá permitir a transmissão sexual. A identificação deste reservatório abre novos caminhos para pesquisas futuras sobre o tropismo parasitário e o desenvolvimento de novas drogas mais eficazes.

Key-words: Human African trypanosomiasis, Male reproductive system, Sexual transmission

Trypanosoma brucei is the causative agent of Human African trypanosomiasis, also known as sleeping sickness. Disease progression usually begins with a haemo-lympathic phase, followed by parasite invasion of the central nervous system. Currently no vaccines are available and a limited range of drugs exists to treat this disease, many of them associated with high toxicity. Recent studies have revealed the presence of trypanosomes in the male reproductive system. When considering trypanocidal drug development reproductive organs are of interest, since parasites that infiltrate and persist in the male gonads may be protected from drugs by the blood-testis barrier. Since there is epidemiological evidence in humans for the sexual transmission of T. brucei, understanding if and how trypanosomes are distributed in the male reproductive system may also help identifying the pathways underlying sexual transmission of the disease. Here we characterized the infection in the mouse male reproductive system using an animal model and showed, through histological analysis, parasites and inflammatory cells infiltrating the male reproductive system later in the infection, especially in the epididymis. Parasite density, determined by quantitative PCR of genomic DNA, confirmed that parasite load increased overtime. Transmission electron microscopy showed that even when found in higher numbers, trypanosomes in the epididymis had severe morphological changes consistent with cell death, possibly due to the immune response seen later on. Overall, we propose that the inflammatory cell infiltration may compromise drug diffusion, enabling reproductive organs to act as a reservoir for parasites. Also, parasite distribution in epididymis may enable sexual transmission. The identification of this reservoir opens new pathways to future research concerning parasite tropism and development of new and more efficient drugs.

Alunos | **Students:** Miguel Leal Rato

Tutores | **Tutors:** Joaquim Ferreira

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Laboratório de Farmacologia Clínica e Terapêutica

E-mail: mlrato@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PG/02

Título: Efeito Nocebo na doença de Parkinson: revisão sistemática e meta-análise

Title: Nocebo effect in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis

Palavras-Chave: Doenca de Parkinson, nocebo, placebo

Introdução: O efeito placebo está bem reconhecido na doença de Parkinson (PD), e pensa-se que seja em parte devido a um aumento da transmissão dopaminérgica. O efeito nocebo – ocorrência de efeitos adversos (AE) após administração de um placebo -, por sua vez, ainda está mal caracterizado.

Objetivo: Estimar a resposta nocebo na PD e caracterizar os seus determinantes.

Métodos: Foram pesquisadas bases de dados até fevereiro de 2017. Foram incluídos ensaios clínicos randomizados, paralelos, controlados por placebo em doentes com PD. A resposta nocebo foi definida como a proporção de doentes com efeitos adversos no braço placebo. Foi ainda caracterizada como a proporção de doentes que não completou o ensaio, proporção de doentes que não completou o ensaio por AE e proporção de mortes no braço placebo. Para agregar a informação, foi feita uma meta-análise tipo random-effects. A heterogeneidade estatística foi avaliada através do I2 .As mesmas análises foram repetidas para os dados obtidos dos braços de intervenção de forma a estabelecer um termo de comparação.

Resultados: Incluímos 239 ensaios ensaios clínicos randomizados (47797 participantes). A resposta nocebo agregada foi de 55,8% (95% CI 51,5%–60,1%, 149 ensaios; I2=97.5%). 13,9% (95% CI 12,4%–15,4%, 229 ensaios; I2=90,54%) doentes não completaram o ensaio, 5,7% (95% CI 5,0%–6,4%, 222 ensaios; I2=72,44%) não completaram devido a AE e 0,6% (95% CI 0,5%–0,7%, 231 trials; I2=0%) morreram durante o decorrer dos ensaios.

Conclusão: A magnitude da resposta nocebo em ensaios clínicos paralelos randomizados de PD é substancial. O desenho, planeamento e avaliação de ensaios clínicos futuros devera ter este efeito em conta.

Key-words: Parkinson's disease, placebo, nocebo

Background: The placebo effect is well recognized in Parkinson's disease (PD) and is thought to be at least in part the result of an increase in dopaminergic neurotransmission. Its counterpart, the nocebo effect, remains ill-characterized.

Objective: To estimate the nocebo response in PD, and characterize its determinants.

Methods: Databases were searched up to February 2017. Randomized, parallel-designed, placebo-controlled trials of patients with PD were included. Nocebo response was defined as the proportion of patients experiencing adverse events in the placebo arm. It was further characterized as the proportion of withdrawals, withdrawals due to AE and deaths in the placebo arm. Random-effects meta-analysis was used to pool data. Statistical heterogeneity was assessed with I2 statistic. The same analyses were repeated with data from the intervention arm to provide a term of comparison.

Results: We included 239 randomized controlled trials (47797 participants). Pooled nocebo response was 55,8% (95% CI 51,5%–60,1%, 149 trials; I2=97.5%). 13,9% (95% CI 12,4%–15,4%, 229 trials; I2=90,54%) patients withdrew from trials, 5,7% (95% CI 5,0%–6,4%, 222 trials; I2=72,44%) did it because of AE and 0,6% (95% CI 0,5%–0,7%, 231 trials; I2=0%) died during follow up. Similar proportions were identified in patients in intervention arms.

Conclusion: The magnitude of the nocebo response in parallel-designed randomized clinical trials in PD is substantial. This information should be integrated in the evaluation, planning and designing of future clinical trials.

Posters

Alunos | **Students:** David Alves Berhanu

Tutores | **Tutors:** Lia Lucas Neto

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

E-mail: davidb@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PG/04

Título | Title: Cortical-Amygdala Volumetric Ratios Predict Onset of Symptoms of Psychosis in 22q11.2 Deletion Syndrome

Palavras-Chave:

Key-words: Cortical-amygdala ratios; psychosis; velocardiofacial syndrome; cingulate; insula

Dysfunction of cortical circuitry involving prefrontal cortex, cingulate gyrus and mesial temporal lobe has been implicated in the pathophysiology of psychotic symptoms. 22q11.2 deletion syndrome (22q11DS) is a neurogenetic disorder that comports a 25-fold increased risk of developing psychosis. Morphological changes in the neuroanatomy of this syndrome may represent a biological risk factor for the development of psychosis.

The present study explored ratios between cortical volumes and the amygdala. We also explored relationships between these ratios and the eventual development of psychosis in youth with 22q11DS. A group of 73 individuals with 22q11DS and 27 unaffected siblings were followed every three years, at four timepoints. We analyzed baseline ratios between 34 bilateral FreeSurfer-generated cortical volumes and amygdala, and examined whether baseline cortical ratios predicted positive symptoms of psychosis 12 years later, at the 4th timepoint. Youth with 22q11DS demonstrated significantly smaller cortical volume-to-amygdala ratios in left anterior cingulate, occipital and parietal cortices. An increased risk of developing psychotic episodes in individuals with 22q11DS was associated with a lower cortical volume-to-amygdala ratio, suggesting that cortico-limbic circuitry may play an important role in emotional modulation and may underlie the pathophysiology of positive symptoms of psychosis.

Alunos | **Students:** Bernardo Crespo Pimentel

Tutores | **Tutors:** José Ferro

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

E-mail: bpimentel@gmail.com

Projeto | **Project**

2017 PG/05

Título | Title: Diagnostic workup and etiological diagnosis of ischemic stroke in young adults: a retrospective two-center comparison

Palavras-Chave:

Key-words: cryptogenic stroke, large vessel disease, cardioembolic stroke

Background: Ischemic stroke in young adults is a disastrous event that causes death and disability. Cryptogenic stroke is much more common in young adults than in older patients. Strategies for diagnostic assessment vary widely: a comprehensive approach requires a full-evaluation of patients, a staged workup emphasizes local prevalence of potential causes and a selective approach is based on clinical hints.

Objectives: This study aims to compare the etiology and workup strategy of ischemic stroke in young adults between stroke units of two tertiary hospitals in Europe. It investigates the influence of workup variations in etiological classification, ultimately aiming to identify the most effective diagnostic approach.

Methods: This retrospective study enrolled patients aged 18 to 55 years admitted for ischemic stroke or TIA to the stroke units of Santa Maria Hospital in Lisbon, Portugal, and Innsbruck State Hospital in Innsbruck, Austria, between 2014 and 2016. Etiology and diagnostic procedures were compared between centers using independent Student t-test and Pearson's chi-squared test.

Results: A total of 156 patients from Innsbruck State Hospital and 110 patients from Santa Maria Hospital were enrolled. No differences in stroke etiology were found. CT scan was more performed in Lisbon, whereas in Innsbruck CT/MR angiography for extra- and intracranial vessel evaluation was preferred. Transcranial Doppler with and without contrast and TTE were more common in Lisbon, while TEE was more frequently performed in Innsbruck. Thrombophilia and autoimmune disorders were more often screened in Lisbon and ophthalmologic and dermatologic evaluation were more frequent in Innsbruck.

Conclusion: The small variations found in the diagnostic workup between centers did not influence etiology diagnosis and may suggest that use of CT/MRI angiography is not advantageous over less costly tests for vessel imaging. Likewise, extensive laboratory testing doesn't seem to influence diagnosis of other determined cause stroke, thereby emphasizing the importance of a selective diagnostic approach.

Alunos | **Students:** David Alexandre de Azoia Ferreira Prescott

Tutores | **Tutors:** João Nuno Guerra da Costa

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Laboratório Farmacologia Clínica e Terapêutica | Laboratory of Clinical Pharmacology and Therapeutics

E-mail: davidaaf@gmail.com

Projeto | **Project**

2017 PG/07

Título | Title: : Estimulação Cerebral Profunda na Distonia | Deep Brain Stimulation in Dystonia

Palavras-Chave: Distonia; Estimulação Cerebral Profunda; Revisão Sistemática

Fundamento: A distonia é um distúrbio doloroso e incapacitante caracterizado por uma postura involuntária dolorosa das regiões afetadas. A estimulação cerebral profunda (ECP) é uma intervenção tipicamente reservada para casos refratários ou graves, embora existam incertezas quanto à sua eficácia, segurança e tolerabilidade.

Objectivos: Comparar a eficácia, segurança e tolerabilidade da ECP versus estimulação simulada, melhor terapia médica ou placebo em pessoas com distonia.

Métodos: Identificaram-se estudos para inclusão na revisão usando o Cochrane Movement Disorders Group Trials Register, the Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL), MEDLINE, Embase, listas de referência de artigos incluídos, procedimentos de conferência, literatura cinzenta e registros de ensaios clínicos até Julho de 2017. Foram incluídos ensaios clínicos duplo-cegos, paralelos, randomizados e controlados (RCTs) comparando ECP versus estimulação simulada, melhor terapia médica ou placebo em adultos com distonia. Realizaram-se meta-análises usando um modelo de efeitos aleatórios. O resultado de eficácia primário foi a melhoria em qualquer escala sintomática validada e o resultado de segurança primária foi eventos adversos.

Resultados: Incluímos dois RCTs, incluindo um total de 102 participantes. Ambos os ensaios avaliaram o efeito do DBS no núcleo de GPi, com avaliação de resultados aos 3 e 6 meses de estimulação. Um dos estudos incluiu participantes com distonia generalizada e segmentar, enquanto o outro incluiu participantes com distonia cervical. Ambos os estudos foram considerados de alto risco para vários domínios.

A ECP pode melhorar o comprometimento relacionado com a distonia cervical, com uma diferença média de 9.8 unidades (IC 95% 16.08 menos para 3.52 unidades menos) mais baixas na Toronto Western Spasmodic Torticollis Rating Scale (TWSTRS) aos 3 meses. Não temos certeza de que a ECP melhore o comprometimento geral relacionado com a distonia generalizada ou segmentar. A ECP pode ter pouca ou nenhuma diferença no risco de eventos adversos e na tolerabilidade (RR 1.58, IC 95% 0.98 a 2.54).

Conclusões: Evidência de baixa qualidade mostra que a ECP pode melhorar a eficácia geral no tratamento da distonia cervical em adultos com distonia moderada a severa. Devido a uma qualidade de evidência muito baixa, não é claro se a ECP melhora a eficácia geral na distonia generalizada e segmentar. O tratamento com ECP parece seguro e tolerável. São necessários estudos adicionais para estabelecer eficácia clínica, segurança e tolerabilidade.

Key-words: Dystonia; Deep Brain Stimulation; Systematic Review

Background: Dystonia is a painful and disabling disorder characterised by painful involuntary posturing of the affected region(s). Deep brain stimulation (DBS) is an intervention typically reserved for refractory or severe cases, although uncertainty exists regarding its efficacy, safety and tolerability.

Objectives: To compare the efficacy, safety, and tolerability of DBS versus sham-stimulation, best medical therapy or placebo in people with dystonia.

Methods: We identified studies for inclusion in the review using the Cochrane Movement Disorders Group Trials Register, the Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL), MEDLINE, Embase, reference lists of included articles, conference proceedings, grey literature, and clinical trial registries up to July 2017. Double-blind, parallel, randomised, controlled trials (RCTs) comparing DBS versus sham-stimulation, best medical care or placebo in adults with dystonia were included. We performed meta-analyses using a random-effects model. The primary efficacy outcome was improvement on any validated symptomatic rating scale, and the primary safety outcome was adverse events.

Main results: We included two RCTs, enrolling a total of 102 participants. Both trials evaluated the effect of DBS on the GPi nucleus, with outcome assessment at 3 and 6 months of stimulation. One of the studies included participants with generalised and segmental dystonia, while the other included participants with cervical dystonia. Both studies were considered at high risk for several domains.

DBS may improve cervical dystonia related impairment, with a mean difference of 9.8 fewer units (95% CI 16.08 fewer to 3.52 fewer units) on the Toronto Western Spasmodic Torticollis Rating Scale (TWSTRS) at 3 months. We are uncertain whether DBS improves overall generalised or segmental dystonia related impairment. DBS may have little or no difference in the risk of adverse events and tolerability (RR 1.58, 95% CI 0.98 to 2.54).

Conclusions: Low quality evidence shows that DBS may improve overall efficacy in the treatment of cervical dystonia in adults with moderate to severe dystonia. Due to very low quality of evidence, it is unclear whether DBS may improve overall efficacy in generalised and segmental dystonia. Treatment with DBS may appear to be safe and tolerable. Further research is still needed to establish clinical efficacy, safety and tolerability.

Alunos | **Students:** Catarina Martins O'Neill

Tutores | **Tutors:** Luís Rocha Lopes

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Silva-Santos Lab

E-mail: maia@cshl.edu

Título: Centro Cardiovascular da Universidade de Lisboa (CCUL) e Serviço Cardiologia do Hospital Garcia de Orta (HGO)

Title: Myocardial deformation imaging study with cardiac magnetic resonance in patients with hypertrophic cardiomyopathy

Palavras-Chave: Miocardiopatia Hipertrófica, Ressonância Magnética Cardíaca, *Strain*

Fundamento: A miocardiopatia hipertrófica (MCH) é a doença cardíaca hereditária mais comum, presente em 1/500 indivíduos. É uma causa importante de morte súbita cardíaca (MSC), insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral. A ressonância magnética cardíaca (RMC) é o método mais preciso na avaliação da função ventricular esquerda (VE), devido ao excelente contraste sangue-tecido e elevada reprodutibilidade. A avaliação da deformação do miocárdio tem valor diagnóstico e prognóstico adicional noutras doenças cardiovasculares. Recentemente, a *Feature Tracking Imaging* (FTI) provou ser um método fiável para a avaliação da deformação do miocárdio com RMC.

Objetivo: Investigar o valor diagnóstico e prognóstico da avaliação de deformação por FTI-RMC na MCH.

Métodos: Foram avaliados doentes (dts) consecutivos com MCH com teste genético, eletrocardiograma, ecocardiograma, *Holter*, prova de esforço e RMC. Retrospectivamente foi realizado FTI para avaliação da deformação VE, incluindo *peak strain* radial, circunferencial e longitudinal.

Resultados: Foram estudados cinquenta e sete dts, média de idades 57,4 ± 14,3 anos, 35 do sexo masculino (61,4%). A espessura máxima da parede (EMP) do VE foi de 19,8 ± 5,1 mm, a massa do VE 164,4 ± 71,4 g, a fração de ejecção do VE (FEVE) 60,8 ± 11,5%; 66,7% dts apresentavam realce tardio (RT). O *score* de risco de MSC foi 2,8 ± 4,4%. O *strain* radial global (SRG) foi de 32,5 ± 12,8%, o *strain* longitudinal global (SLG) -13,7 ± 4,8% e o *strain* circunferencial global (SCG) -16,6 ± 5,2%. Dezassete dts (29,8%) apresentavam SRG diminuído, 14 (24,5%) SLG diminuído e 14 (24,5%) SCG diminuído. Seis dts (10,5%) tinham FEVE <50%. O SRG correlacionou-se significativamente com o volume tele-diastólico do VE (VTDVE) (-0,34, p=0,014), volume tele-sistólico do VE (-0,43, p=0,001), FEVE (0,41, p=0,002), EMP (-0,34, p=0,16) e massa (-0,50, p<0,0005). SR basal mostrou uma correlação significativa com o *score* de risco de MSC (-0,32, p=0,03). SLG encontrava-se significativamente correlacionado com o número de segmentos hipertrofiados (0,34, p=0,02), massa (0,33, p=0,016) e área auricular esquerda (0,42, p=0,005). SCG correlacionou-se significativamente com VTDVE (0,32, p=0,02), VTSVE (0,41, p=0,003), FEVE (-0,38, p=0,005), EMP (0,33, p=0,19) e massa (0,50, p <0,0005). SC basal mostrou uma correlação significativa com o *score* de risco de MSC (0,34, p=0,02). Dts com taquicardia ventricular não mantida (TVNM) mostraram pior SR basal e médio (26,7 ± 11,3 vs 35,3 ± 12,4%, p=0,04; 23,6 ± 12,5 vs 35,8 ± 13,8%, p=0,012) e SC basal e médio (-14,4 ± 4,7 vs -17,9 ± 4,1%, p=0,019; -14.4 ± 6.0 vs -19.2 ± 5.1%, p=0,013). A prevalência de fibrilhação auricular (FA) era superior em dts com SLG diminuido (27.3% vs 3.1%, p=0,017). A presença de RT associou-se à redução do SCG (92,9% vs 64,1%, p=0,04). Um valor de *cut-off* de -14,4% para o SC basal apresentava uma sensibilidade de 0,75 e uma especificidade de 0,81 para prever TVNM (AUC 0,745, p=0,013).

Conclusões: A avaliação do *strain* radial, circunferencial e longitudinal com *FTI* é viável e tem valor diagnóstico adicional. A redução da deformação miocárdica encontrava-se associada com: a) marcadores imagiológicos de gravidade da doença, tais como a massa e o RT; b) *end-points* arrítmicos clinicamente relevantes, FA e TVNM; c) *score* de risco de MSC. A avaliação da contratilidade com *FTI* poderá revelar-se um novo e importante biomarcador de prognóstico na MCH.

Key-words: Hypertrophic Cardiomyopathy, Cardiac Magnetic Resonance, Strain

Background: Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common inherited cardiac disease, present in 1/500 individuals. It is a major cause of sudden cardiac death (SCD), heart failure and stroke. Cardiac magnetic resonance (CMR) is the most accurate method for the evaluation of left ventricular (LV) function due to excellent blood-to-tissue contrast and high reproducibility. Myocardial deformation assessment provides incremental diagnostic and prognostic value in other cardiovascular diseases. Feature tracking imaging (FTI) has recently been proven as a reliable method to measure myocardial deformation with CMR.

Objectives: To investigate the diagnostic and prognostic value of FTI-CMR deformation imaging in patients with HCM.

Methods: Consecutive HCM cases were evaluated with genetic testing, ECG, echocardiogram, Holter, stress test and CMR. FTI for assessment of LV deformation was retrospectively conducted, including radial, circumferential, and longitudinal peak strain.

Results: Fifty-seven patients (pts) were studied, 57.4±14.3 years-old, 35 males (61.4%). LV maximal wall thickness (MWT) was 19.8±5.1mm, LV mass 164.4±71.4 g, LV ejection fraction (LVEF) 60.8±11.5%. Late gadolinium enhancement (LGE) present in 66.7% pts. SCD risk score was 2.8±4.4%. Global radial strain (GRS) was 32.5±12.8%, global longitudinal strain (GLS) -13.7±4.8% and global circumferential strain (GCS) -16.6±5.2%. Seventeen pts (29.8%) had reduced GRS, 14 (24.5%) reduced GLS and 14 (24.5%) reduced GCS. Six pts (10.5%) had LVEF<50%. GRS was significantly correlated with LV end-diastolic volume (LVEDV) (-0.34, p=0.014), LV end-systolic volume (LVESV) (-0.43, p=0.001), LVEF (0.41, p=0.002), MWT (-0.34, p=0.16) and mass (-0.50, p<0.0005). Basal RS showed a significant correlation with SCD risk score (-0.32, p=0.03). GLS was significantly correlated with number of hypertrophied segments (0.34, p=0.02), mass (0.33, p=0.016) and left atrial area (0.42, p=0.005). GCS was significantly correlated with LVEDV (0.32, p=0.02), LVESV (0.41, p=0.003), LVEF (-0.38, p=0.005), MWT (0.33, p=0.19) and mass (0.50, p<0.0005). Basal CS showed a significant correlation with SCD risk score (0.34, p=0.02). Pts with non-sustained ventricular tachycardia (NSVT) showed worse basal and medial RS (26.7±11.3 vs 35.3±12.4%, p= 0.04; 23.6±12.5 vs 35.8±13.8%, p=0.012) and CS (-14.4±4.7 vs -17.9±4.1%, p=0.019; -14.4±6.0 vs -19.2±5.1%, p=0.013). The prevalence of atrial fibrillation (AF) was higher in pts with reduced GLS (27.3% vs 3.1%, p=0.017). The presence of LGE was associated with reduced GCS (92.9% vs 64.1%, p=0.04). A cut-off value of -14.4% of basal CS had a sensitivity of 0.75 and specificity of 0.81 to predict the presence of NSVT (AUC 0.745, p=0.013).

Conclusions: Assessment of radial, circumferential and longitudinal strain with FTI is feasible and provides incremental diagnostic value. Worse deformation was associated with: a) imaging markers of disease severity, such as mass and LGE; b) clinically relevant arrhythmic end-points, such as AF and NSVT; c) SCD risk score. Thorough evaluation of contractility with deformation imaging may prove to be a relevant and novel prognostic biomarker in HCM.

Alunos | **Students:** Ricardo Filipe Domingos Grilo

Tutores | **Tutors:** Cláudia Maria Coelho de Faria

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Clínica Universitária de Neurocirurgia / Neurosurgery Universitary Centre

E-mail: grilo@campus.ul.pt

Título | Title: Astrocitoma Pilocítico em Idade Pediátrica – Um Estudo Retrospectivo / Pediatric Pilocytic Astrocytoma – A Retrospective Study

Palavras-Chave: Astrocitoma Pilocítico; Idade Pediátrica; Estudo Retrospectivo

Objetivo: O astrocitoma pilocítico é o tumor cerebral mais frequente nas crianças. É um tumor benigno classificado como grau I pela World Health Organization, tem geralmente bom prognóstico, e o seu tratamento de eleição é a remoção cirúrgica completa, reservando-se os tratamentos adjuvantes para casos de recidiva ou progressão tumoral. O objectivo deste estudo é caracterizar uma população pediátrica portuguesa com diagnóstico de astrocitoma pilocítico e compará-la com outras séries europeias publicadas.

Métodos: Recorrendo a uma análise retrospectiva dos casos de astrocitoma pilocítico em idade pediátrica (crianças com idade inferior a 18 anos) operados no Hospital de Santa Maria – Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE entre 2000 e 2015, este trabalho tem por objectivo a análise dos dados epidemiológicos, demográficos, e clínicos destes pacientes, e posterior comparação dos resultados com os publicados noutras séries europeias semelhantes.

Resultados e Conclusão: Foram avaliados 55 pacientes, num total de 59 cirurgias, com diagnóstico histológico pós-operatório de astrocitoma pilocítico. A idade média foi 8,42 anos e o rácio masculino:feminino foi 1,39. O cerebelo foi a localização tumoral mais frequente, e na maioria dos doentes foi possível uma remoção completa. A sobrevida livre de doença foi de 45,45% e a taxa de sobrevida global foi de 70,90%. Em relação às séries europeias já publicadas, os nossos resultados, apesar de apresentarem algumas diferenças, revelaram-se bastante comparáveis.

Key-words: Pilocytic Astrocytoma; Pediatric Age; Retrospective Study

Objective: Pilocytic astrocytoma is the most common brain tumor in children. It is a benign tumor, classified as grade I by the World Health Organization, and it usually has good prognosis. The gold standard in the treatment of pilocytic astrocytoma is complete surgical resection, with adjuvant therapies reserved for tumor recurrence or tumor progression. The main goal of this study is to characterize a Portuguese pediatric population diagnosed with pilocytic astrocytoma and to compare the results with other published European series.

Methods: Using a retrospective analysis of pilocytic astrocytoma patients in pediatric age (children under the age of 18 years old) who underwent surgery at Hospital de Santa Maria – Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE between 2000 and 2015, we will analyze the epidemiologic, demographic, and clinical data and, afterwards, we will compare the results with those published in other similar European series.

Results and Conclusion: 55 patients were evaluated, in a total of 59 surgeries, who had a histological diagnosis of pilocytic astrocytoma. The mean age was 8,42 years and the male:female ratio was 1,39. The cerebellum was the most frequent tumor location, and in the majority of patients a complete surgical resection was possible. The disease-free survival was 45,45%, whereas the overall survival was 70,90%. Regarding other published European series, our results, although with some differences, were comparable.

20 ANOS DE "EDUCAÇÃO PELA CIÊNCIA"!

20º PROGRAMA
EDUCAÇÃO PELA CIÊNCIA
Projetos de Investigação Laboratorial ou Clínica

BOLSAS CHLN/FMUL
Projetos de Investigação Clínica

SESSÕES POSTERS |

Moderadores: Bruno Miranda / Doroteia Silva

20º PROGRAMA
EDUCAÇÃO PELA CIÊNCIA
Projetos de Investigação Laboratorial ou Clínica

BOLSAS CHLN/FMUL
Projetos de Investigação Clínica

Alunos | **Students:** Cláudia Santos Silva[1]

Tutores | **Tutors:** Mamede de Carvalho[1], João Costa[2]

Laboratório, Centro ou Unidade: [1]Instituto de Fisiologia, FMUL, iMM; [2]Laboratório de Farmacologia Clínica e Terapêutica, FMUL
Laboratory, Centre, Unit: [1]Institute of Physiology, FMUL, iMM; [2]Laboratory of Clinical Pharmacology and Therapeutics, FMUL

E-mail: claudiasilva2@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/05

Título: Valor prognóstico do estudo de condução do nervo frénico na esclerose lateral amiotrófica – uma revisão sistemática e meta-análise

Title: Prognostic value of phrenic nerve conduction study in amyotrophic lateral sclerosis – a systematic review and meta-analysis

Palavras-Chave: Esclerose Lateral Amiotrófica, Nervo Frénico, Prognóstico

Fundamento: A esclerose lateral amiotrófica é uma doença neurodegenerativa rara e de rápida progressão, que tipicamente envolve os músculos dos membros, bulbares e respiratórios. A insuficiência respiratória é responsável pela maioria das mortes nesta doença. A sua rápida deteção é importante para o acompanhamento destes doentes. As provas de função respiratória (PFR) são considerados os testes mais utilizados e fiáveis para monitorizar a insuficiência respiratória nos doentes com ELA. Destes, a capacidade vital forçada (FVC) é considerada o gold-standard. Contudo, depende da colaboração dos doentes, que pode estar limitada em doentes com paresia orofacial e alterações cognitivas. O estudo de condução do nervo frénico (PNCS) é um teste rápido e barato que ultrapassa as limitações das PFR, uma vez que não depende da colaboração dos doentes. Neste, a componente muscular do potencial de ação é registado, aplicando uma técnica de registo percutâneo, sendo obtidos a sua amplitude e latência.

Objetivos: O objetivo primário foi aferir o valor prognóstico dos PNCS nos doentes com ELA.

Métodos: Conduzimos uma revisão sistemática de estudos observacionais que comparavam os resultados do nosso teste em estudo, PNCS, e o teste de referência, PFR, em adultos com diagnóstico definitivo ou provável de ELA, como definido pelos critérios El Escorial. Pesquisámos nas bases de dados MEDLINE (pela Ovid), EMBASE (pela Ovid), e Web of Science até Outubro de 2017. Dois revisores independentes reviram os títulos e resumos, os textos completos e fizeram a extração dos dados de prognóstico, utilizando o Covidence®. Considerámos como resultados de prognóstico: os hazard ratios para mortalidade, utilizando diferentes cut-offs de amplitude de CMAP, assim como a correlação entre a FVC e a amplitude, e a entre o FVC e a latência do CMAP. O risco de viés foi avaliado utilizando a ferramenta Quality In Prognosis Studies (QUIPS). Para efetuar a meta-análise dos hazard ratios, utilizámos o método do inverso da variância para efeitos aleatórios. Para os resultados de medida de efeito de variáveis contínuas, transformámos o coeficiente de correlação na escala de z de Fisher, e efetuámos a meta-análise utilizando o método do inverso da variância, apresentando os resultados convertidos de novo a correlações. A heterogeneidade dos resultados foi avaliada com I2. Foi considerado um valor de $p<0.05$ como estatisticamente significativo. Avaliámos a qualidade da evidência utilizando o Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation (GRADE), aplicado a estudos de avaliação prognóstica.

Resultados: Um total de 365 referências (MEDLINE 120, EMBASE 170, Web of Science 55) foram obtidas pela pesquisa eletrónica. Após exclusão das referências repetidas, 233 foram obtidas para revisão por título e resumo. Destas, excluímos 204 referências. O texto completo de 29 referências foi examinado. Destes, 21 estudos foram excluídos. Oito estudos cumpriam os critérios de inclusão. Todos eles são estudos observacionais, incluindo um total de 604 participantes. A idade destes variou entre 58.2 e 61.5 anos, com uma duração de doença entre os 16.0 e 27.6 meses.

Conclusão: A restante análise dos dados encontra-se a decorrer, e os resultados primários serão apresentados no 20º Workshop "Educação pela Ciência".

Key-words: Amyotrophic Lateral Sclerosis, Phrenic Nerve, Prognosis

Background: Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a rare and rapidly progressive neurodegenerative disease, typically involving limb, bulbar and respiratory muscles. Respiratory failure (RF) is the main cause of death in ALS. Therefore, early detection of RF is critical in the follow-up of these patients. Pulmonary function tests (PFT) are thought to be the most useful and reliable test to monitor respiratory function in ALS patients. Of these, forced vital capacity (FVC) is considered the gold-standard. However, FVC results are strongly dependent on the collaboration of the patient, which can be compromised in patients with orofacial paresis or cognitive abnormalities. Phrenic nerve conduction study (PNCS) is an easy, quick and inexpensive test that overcomes these PFT limitations as it does not depend on patient collaboration. In this test, a phrenic nerve compound muscle action potential (CMAP) is recorded using surface records and its latency and amplitude are measured.

Objectives: The primary objective was to ascertain the prognostic value of PNCS in ALS patients.

Methods: We conducted a systematic review of observational studies that compared the results of the index test, PNCS, with the reference standard, PFT, in adults with a diagnosis of definite or probable ALS, as defined by the modified El Escorial criteria. We searched the MEDLINE (via Ovid), EMBASE (via Ovid), and Web of Science databases up to October 2017. Two review authors independently screened titles and abstracts for relevance, assessed full texts for inclusion, and carried out data extraction for prognosis using Covidence®. We considered as outcomes for prognosis the hazard ratios for mortality using different cut-offs of the CMAP amplitude, the correlation between FVC and CMAP amplitude and between FVC and CMAP latency. Risk of bias was performed using the Quality In Prognosis Studies (QUIPS) tool. Hazard ratios were pooled by means of a random-effects generic inverse-variance method. To pool the effect sizes of correlations of continuous variables, we transformed the correlation coefficient into a Fisher's z scale and performed a meta-analysis using random-effect inverse-variance approach, with the results back-transformed to correlation coefficients. We assessed heterogeneity with the I2. A p-value <0.05 was considered statistically significant. We evaluated the quality of the evidence using the Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation (GRADE) working group methods extended to prognosis factor research.

Results: A total of 365 references (MEDLINE 120, EMBASE 170, and Web of Science 55) were retrieved through the electronic search. After automatic and manual deduplication, 233 references had their title and abstract screened. Of these, we excluded 204 references. The full text of 29 references were exanimated in more detail. Of these, 21 studies were excluded. Eight studies met the inclusion criteria and were included.

All 8 included studies were observational, and included a total of 604 participants. The participants' age ranged from 58.2 to 61.5 years, with a disease duration between 16.0 and 27.6 months.

Conclusion: Data analysis is currently ongoing and the primary results are going to be presented at the 20th "Educação pela Ciência" workshop.

Alunos | **Students:** Beatriz Mestre e Carla Novais

Tutores | **Tutors:** Edgar Almeida; Manuel Bicho

Laboratório, Centro ou Unidade: Disciplina de Nefrologia, FMUL; Laboratório de Genética, FMUL
Laboratory, Centre, Unit: Nephrology Unit, FMUL; Genetics Laboratory, FMUL

E-mail: edgar.almeida@hbeatrizangelo.pt; manuelbicho@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/15

Título | **Title:** Análise de Biomarcadores urinários na doença poliquística renal autossómica dominante | Study of urinary biomarkers in autossomic dominant polycystic kidney disease

Palavras-Chave: DPRAD; Biomarcadores; Progressão

Fundamento: A doença poliquística renal autossómica dominante (DPRAD) manifesta-se pela progressiva formação de quistos renais, aumentando em número e tamanho, e pelo aparecimento de fibrose intersticial, culminando num declínio da função renal (DFR) e, em última instância, na necessidade de terapia renal de substituição. Estudo de novos biomarcadores urinários poderá contribuir para uma maior precisão da deteção precoce do DFR na DPRAD.

Objetivos: Caracterizar uma população de pacientes com DPRAD e, posteriormente, analisar os biomarcadores urinários α-glutationo s-transferase (α-GST), haptoglobina (Hp) e correlacionar com a gravidade da doença avaliada pela estimativa do filtrado glomerular (TFG) e pelas dimensões dos rins

Métodos: Durante 7 meses, foram recrutados 13 doentes com DPRAD, seguidos na consulta de Nefrologia do Hospital Beatriz Ângelo. Os doentes foram diagnosticados de acordo com os critérios de Ravine, com follow-up mínimo de 60 meses e determinações seriadas de creatinina sérica. Foi adicionado tampão estabilizador urinário às amostras de urina centrifugadas para determinação do α-GST e Hp, conservadas a -20ºC. Os biomarcadores urinários serão determinados por ensaios imunoenzimáticos. Procedeu-se a uma análise descritiva dos dados e aplicação dos testes de comparações de médias t-student para amostras independentes (a) e amostras emparelhadas (b). Resultados significativos para P<0.05.

Resultados: A média de idades dos doentes DPRAD selecionados foi de média 43.0±14.7 anos (média±DP). A maioria do sexo feminino (n=7, 53.8% versus n=6 masculino, 46.2. 6 doentes não apresentam história familiar de DPRAD. Relativamente à função renal obteve-se a seguinte informação: creatinina sérica basal 0.10±0.44mg/dL; TFG 98.4±30.9 mL/min/1.73m2. Segundo os resultados ecográficos iniciais, categorizou-se o tamanho do rim entre 120-150mm (n=4 rim direito (RD); n=3 rim esquerdo(RE)) e >150mm (n=4 RD; n=5 RE). Ao fim de 5 anos, verificaram-se diferenças significativas na creatinina sérica, aumentou para 1.44±1.03mg/dL (P=0.040, b) e a TFG diminui para 77.5±42.6 mL/min/1.73m2 (P=0.019, b) em relação ao basal. De acordo com a estratificação do CKD-EPI: n=3 doentes estadio 1; n=5 estadio 2; n=1 estadio 3b; n=1 estadio 4 e n=1 estadio 5. Agrupando os doentes por estadios (CKD1-2 e CKD3-5), verificou-se, ao fim de 5 anos, que os doentes em estadios mais avançados apresentavam aumento de Hp (P=0.003) e GST- α (P=0.071).

Conclusões: Concordante com a literatura, ao fim de 5 anos, verificou-se um comprometimento da DFR nos doentes com DPRAD, o que foi observado na nossa amostra, tendo em conta o tamanho dos rins inicial e os valores de creatinina séria e TFG. A determinação de biomarcadores urinários poderão contribuir para uma deteção precoce com vista à seleção de doentes com maiores benefícios na utilização das terapêuticas inovadoras.

Key-words: ADPKD; Biomarkers; Progression;

Background: Autossomal dominant polycystic kidney (ADPKD) disease is characterized by the progressive development of renal cysts, which grow in size and number, and by the formation of interstitial fibrosis. This leads to a renal function decline (DRF) and, ultimately, in the need for renal replacement therapy. The search for new urinary biomarkers may contribute to improving the precision in early detection of the RFD in ADPKD.

Objectives: To characterize a population of ADPKD patients and, posteriorly, to analyze the urinary biomarkers alpha-glutathione s-transferase (α-GST), haptoglobin (Hp) and correlate these with the severity of the disease by the estimated glomerular filtration rate (GFR) and by the kidneys's size.

Methods: During 7 months, we recruited 13 ADPKD patients, which were followed-up in the Nephrology consult of Hospital Beatriz Ângelo. These patients were diagnosed according Ravine's Criteria, with minimum follow up of 60 months and series of serum creatinine measurements Urinary stabilizer buffer was added to centrifuged urine samples for determination of α-GST and Hp, stored at -20 ° C. The urinary biomarkers will be determined with immunoenzymatic assays. A descriptive analysis of data and application of the comparative tests of t-student averages for independent samples (a) and paired samples (b) were performed. Results significant for P <0.05.

Results: The mean age of selected patients with ADPKD 43.0±14.1 years (mean±SD). Most were female (n = 7, 53.8% versus n = 6 male, 46.2%).6 patients did not present family history of ADPKD. Regarding renal function, the following information was obtained: baseline serum creatinine 0.10±0.44 mg/dL; GFR 98.4±30.9mL /min/1.73m2. According to the initial ultrasound results, the size of the kidney was categorized as 120-150mm (n=4 right kidney, n=3 left kidney) and >150mm (n=4 right kidney, n=5 left kidney). At the end of 5 years, the following significant differences were found in serum creatinine increased to 1.44±1.03 mg/dL (P=0.036, b) and GFR decreased to 77.5±42.6mL/min/1.73m2 (P=0.007, b) in relation to baseline. According to the CKD-EPI stratification: n=3 stage 1 patients; n=4 stage 2; n=2 stage 3b; n=1 stage 4 and n=1 stage 5. Grouping the patients by stages (CKD1-2 and CKD3-5), it was verified, in 5 years, that patients in more advanced stages presented increase of Hp (P=0.003) and GST-α (P=0.071).

Conclusion: According to the literature, after 5 years, we observed a compromised of DRF in patients with ADPKD, taking into account the initial kidney size and the values of serum creatinine and GFR after 5 years. The determination of urinary biomarkers may contribute to an early detection in order to select patients with greater benefits of using innovative therapies such as tolvaptan.

Alunos | **Students:** Carolina Freitas, Ana Isabel Madureira

Tutores | **Tutors:** Edgar Almeida, Manuel Bicho, Ângelo Nobre

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Clínica Universitária (CU) Nefrologia, CU Cirurgia Cardiotorácica, Laboratório de Genética, FMUL

E-mail: edgar.almeida@hbeatrizangelo.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/16

Título: Biomarcadores Tubulares para o Diagnóstico Precoce e Prognóstico da Lesão Renal Aguda no Pós-operatório de Cirurgia Cardíaca

Title: Tubular Biomarkers for the Early Diagnosis and Prognosis of Acute Renal Injury following Cardiac Surgery

Palavras-Chave: lesão renal aguda; cirurgia cardíaca; biomarcadores tubulares

Fundamento: A Cirurgia Cardíaca tem como complicação mais frequente e grave a Lesão Renal Aguda (LRA), com uma incidência até 30% e pode condicionar o aumento da morbi-mortalidade pós-operatória, da duração do internamento e dos custos associados. A fisiopatologia da LRA baseia-se no processo de necrose das células epiteliais do túbulo renal o que leva à libertação de enzimas como o α-GST (túbulo proximal) e o π-GST (túbulo distal).

Objetivos: Avaliar a função renal de doentes submetidos a cirurgia cardíaca eletiva; e, posteriormente, incorporar o possível papel dos biomarcadores α-GST e Hp no diagnóstico precoce da LRA e no prognóstico a curto prazo.

Métodos: Foram incluídos 25 doentes sujeitos a cirurgia cardíaca eletiva (valvular ou coronária) e que não apresentavam disfunção renal grave prévia à cirurgia. Foi colhido sangue e urina antes e após 3 horas. Para a determinação do α-GST e Hp, a urina foi imediatamente centrifugada (800g, 5min, 4ºC) e tendo sido adicionado tampão estabilizador urinário às amostras. Posteriormente, as amostras foram conservadas a -20ºC. Os biomarcadores urinários serão determinados por ensaios imunoenzimáticos (ELISAs). A creatinina sérica foi avaliada diariamente até 72h após procedimento. A LRA será definida e estratificada pela classificação da KDIGO, baseada nas variações da creatinina sérica.

Resultados: Os doentes recrutados tinham uma média de idades de 67.47±13.5 anos (médio±DP), sendo a maioria do sexo masculino (n=16M versus n=9F). Alguns destes doentes apresentavam as seguintes comorbilidades: dislipidémia (n=17), hipertensão arterial (n=19), diabetes mellitus (n=6), doença coronária (n=3), insuficiência cardíaca (n=8), doença vascular periférica (n=3) e doença cérebro-vascular (n=2). A toma de IECA/ ARA (n=6), espironolactona (n=1), diuréticos (n=6), estatinas (n=6), AAS (n=4). Em 21 doentes foram submetidos a cirurgias valvulares 2 cirurgias coronárias e 1 realizou cirurgia coronária e valvular. No decorrer da cirurgia, 17 doentes apresentaram hipotensão, 5 destes realizaram transfusões sanguíneas e foram administrados vasopressores em 16 dos doentes. No pós-operatório houve uma diminuição de doentes hipotensos (n=4) e da prescrição de vasopressores (n=12). Quanto ao diagnóstico de LRA pós-operatório foram identificados 6 doentes. A creatinina sérica aumentou significativamente após 48h do término de cirurgia (P=0.010). Os níveis urinários de α-GST (P=0.084) e Hp (P=0.087) aumentaram após a cirurgia.

Conclusões: Verificou-se uma alteração da função renal pelo aumento dos valores de creatinina nos dias após a cirurgia. Esta situação pode ser reflexo hipotensão pós-cirurgia, o que pode levar à privação do aporte sanguíneo a nível renal, causando ou agravando a lesão. De acordo com os resultados preliminares α-GST e Hp poderão ser importantes biomarcadores mais precoces para antecipar o diagnóstico de LRA após cirurgia.

Key-words: acute renal injury; cardiac surgery; tubular biomarkers

Background: Cardiac Surgery have, as a more frequent and serious complication, Acute Renal Injury (AKI), with an incidence of up to 30%, and may result in increased postoperative morbidity and mortality, duration of hospitalization and associated costs. The pathophysiology of AKI is based on the necrosis process of the renal tubule epithelial cells which leads to the release of enzymes into its interior, with α-GST detected in the proximal tubule and π-GST detected in the distal tubule.

Aims: To evaluate the renal function of patients undergoing elective cardiac surgery; and subsequently incorporate the possible role of α-GST and Hp biomarkers in the early diagnosis of AKI and short-term prognosis.

Methods: Twenty-five patients undergoing elective heart surgery (valvular or coronary) who did not have severe renal dysfunction prior to surgery were included. Blood and urine were collected before and after 3 hours. For quantification of α-GST and Hp, urine was immediately centrifuged (800g, 5min, 4 ° C) and urinary stabilizer buffer was added to the samples. Samples were preserved at -20º C. Urinary biomarkers will be determined by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Serum creatinine was quantified daily up to 72 hours after the procedure. The AKI will be defined and stratified by KDIGO classification, based on variations in serum creatinine.

Results: The recruited patients have a mean age of 67.47 ± 13.5years (mean±SD), most of them male (n=16M versus n=9F). Some of these patients had the following comorbidities: dyslipidemia (n = 17), arterial hypertension (n = 19), diabetes mellitus (n = 6), coronary disease (n = 3), heart failure (n = 3), peripheral vascular disease (n=3) and cerebrovascular disease (n = 2). Taking ACE inhibitors/ ARB (n=6), spironolactone (n=1), diuretics (n=6), statins (n=6) ASA (N=4). Valvular surgeries were performed in 21 patients, 2 coronary surgeries and 1 coronary and valvular surgery. During the surgery, 17 patients presented hypotension, 5 of whom had blood transfusions in a total of 7 and vasopressors were administered in 16 of the patients. In the postoperative period there was a decrease in hypotensive patients (n=4) and in the prescription of vasopressors (n = 12). Serum creatinine increased significantly after 48 hours after surgery (P=0.010). According to the KDIGO criteria, 6 patients with AKI 48h post-surgery were identified. Urinary levels of α-GST (P=0.084) and Hp (P=0.087) increased after surgery.

Conclusion: There was a change in renal function due to an increase in creatinine values in the days after surgery. This situation may be related to post-surgery hypotension, which can lead to deprivation of blood supply at the renal level, causing or aggravating the injury. According to the preliminary results α-GST and Hp may be important early biomarkers to anticipate the diagnosis of AKI after surgery.

Alunos | **Students:** Tiago Manuel Neto Gonçalves

Tutores | **Tutors:** Ana G. Almeida; Pilar Azevedo

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Clínica Universitária de Cardiologia | Cardiology University Clinic

E-mail: tmng@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 BCHLN/10

Título: Envolvimento cardíaco primário na Fibrose Quística. Contributo para o estudo dos mecanismos, padrões clínicos, imagiológicos, disautonómicos e de biomarcadores e o seu impacto prognóstico.

Title: Primary cardiac involvement in Cystic Fibrosis. Contribution to the study of mechanisms, clinical, imaging, dysautonomic and biomarkers' patterns and their prognostic impact.

Palavras-Chave: Fibrose Quística; Miocardiopatia; Função cardíaca

Fundamento: A Fibrose Quística (FQ) é a mais comum doença autossómica recessiva letal em caucasianos, que pode conduzir a cor pulmonale com disfunção ventricular direita, por hipertensão pulmonar secundária à hipóxia crónica e remodelagem vascular pulmonar. Estudos necrópticos e alguns autores têm vindo a demonstrar alterações na estrutura miocárdica das cavidades cardíacas esquerdas, não explicáveis exclusivamente pelo cor pulmonale. A descoberta da existência do cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) em cardiomiócitos suporta também a hipótese de uma miocardiopatia associada à FQ.

Objetivos: Identificar e caracterizar a presença de envolvimento miocárdico primário numa população de adultos com FQ através de avaliação clínica, laboratorial e imagiológica avançada, e secundariamente avaliar a pressão da artéria pulmonar e suas repercussões cardíacas, relacionar os achados com a função respiratória, e determinar as implicações prognósticas.

Métodos: Estudo unicêntrico, observacional, longitudinal, prospetivo. Foi realizada avaliação clínica de sintomas e fatores de risco cardiovascular, qualidade de vida pelo questionário do estado de saúde SF-36, eletrocardiograma (ECG), ecocardiografia-Doppler e deformação miocárdica (strain) por speckle tracking. Foram obtidos dados do estudo genético, provas de função respiratória e tomografia computorizada torácica. Foram ainda recolhidas amostras de sangue para avaliação de biomarcadores de inflamação e lesão miocárdica. Prevê-se incluir 35 doentes.

Resultados: Foram incluídos 17 pacientes (34±8 anos, 52.9% homens) que apresentam em média um FEV1 de 50.3±19%, FVC de 71.4±20%, FEF25-75 de 25.1±23% e envolvimento bronquiectásico extenso (média 4.4±1 lobos). 15 pacientes apresentam sintomas como fadiga, dispneia e palpitações, sendo a classe II da NYHA a mais frequente na amostra (47.1%, n=8). No questionário SF-36, os parâmetros de "Saúde Geral" (43.4±18%) e "Vitalidade" (64.7±14%) foram os mais afetados. O ECG e eco-Doppler convencional não revelaram alterações significativas, com fração de ejeção média de 63.9±4% e excursão do anel tricúspide de 21±4mm. A análise preliminar de strain longitudinal miocárdico revelou valores diminuidos, sugerindo alteração da subclínica da função. Em 12% dos doentes observaram-se critérios de possível disfunção diastólica. A pressão sistólica da artéria pulmonar foi em média de 30.3±6mmHg, com probabilidade intermédia de hipertensão pulmonar em 12% dos doentes.

Conclusões: Os resultados preliminares deste estudo, em doentes com FQ e sintomas cardiovasculares, revelaram ausência de alterações cardíacas significativas pelos métodos convencionais, mas sugerem disfunção miocárdica subclínica expressa em perturbações do strain miocárdico. A finalização do estudo que se encontra em curso permitirá confirmar os resultados e correlacionar os dados com as restantes variáveis laboratoriais, genéticas e disautonómicas, assim como avaliar os preditores prognósticos.

Key-words: Cystic Fibrosis, Cardiomyopathy, Heart Function

Background: Cystic Fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive lethal disease in Caucasians and a cause of cor pulmonale with right ventricular dysfunction due to pulmonary hypertension secondary to chronic hypoxia and pulmonary vasculature remodelling. Necroptic studies and some authors have been revealing pathologic changes in the myocardial structure of the left heart that cannot be explained exclusively by cor pulmonale. The discovery of the existence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in cardiomyocytes also supports the hypothesis of CF-associated cardiomyopathy.

Objectives: Identify and characterize the presence of primary myocardial involvement in a population of adults with CF through a clinical, laboratorial and advanced imaging evaluation and secondarily to evaluate the pulmonary artery pressure and its cardiac repercussions and to relate cardiac findings with respiratory function determining its prognostic implications.

Methods: Unicentric, observational, longitudinal, prospective study. We performed a clinical evaluation of symptoms and cardiovascular risk factors, quality of life assessment by 36-Item Short Form Health Survey (SF-36), electrocardiogram (ECG), Doppler-echocardiography and strain rate echocardiography by speckle tracking. We also analysed patients' clinical files to collect genetic studies, respiratory function tests and thoracic computed tomography data. Blood samples were also collected for evaluation of inflammation and myocardial injury biomarkers'. We aim to include 35 patients.

Results: 17 patients were included (age 34±8 years, 52.9% males) who have on average a FEV1 of 50.3±19%, FVC of 71.4±20% and FEF25-75 of 25.1±23% and extensive bronchiectasis involvement (mean 4.4±1 lobes). 15 patients present symptoms such as fatigue, dyspnoea and palpitations with NYHA class II being the most frequent in our group (47.1%, n=8). In the SF-36 survey the parameters of "General Health" (43.4±18%) and "Energy/Fatigue" (64.7±14%) were the most affected. The ECG and echo-Doppler didn't detect significant pathological alterations with mean ejection fraction of 63.9±4% and tricuspid annular plane systolic excursion of 21.7±4mm. The preliminary analysis of the myocardial longitudinal strain has shown altered parameters, suggesting a subclinical myocardial disfunction. In 12% of patients we found criteria of possible diastolic disfunction. Pulmonary artery systolic pressure is on average 30.3±6mmHg, with intermediate probability of pulmonary hypertension in 12% of subjects.

Conclusions: Our preliminary results in patients with CF and cardiovascular symptoms showed the absence of significative cardiac involvement when studied by standard cardiac evaluation techniques but suggest subclinical changes of the ventricular function as myocardial strain alterations. The conclusion of our study, which is still running, will allow the assessment of the results, correlations and prognosis.

Alunos | **Students:** Ana Rita de Sousa Noia de Mendonça Bello e José Vicente Domingues Almeida Craveiro Rocha

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

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Luís Costa Lab

E-mail: abello@campus.ul.pt; j.rocha1@campus.ul.pt; scasimiro@medicina.ulisboa.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/12

Título: O valor prognóstico da proteína YB-1 secretada em doentes com cancro da mama

Title: Prognostic role of secreted YB-1 in patients with breast cancer

Palavras-Chave: YB-1 secretada; biomarcador prognóstico; cancro da mama

A proteína Y box binding protein 1 (YB-1) é um membro da família de fatores de transcrição YBX, codificada pelo gene YBX1. Vários estudos demonstram o envolvimento da YB-1 na carcinogénese, proliferação e progressão tumoral, sendo no geral um biomarcador de mau prognóstico. No entanto, o papel ou relevância da sua forma secretada (sYB-1) ainda não é claro. Num estudo prévio realizado pelo nosso laboratório, numa cohort retrospetiva de doentes com cancro da mama e metástases ósseas, foi encontrada uma correlação significativa entre sYB-1 detetável no soro e uma progressão mais rápida da doença óssea. Neste estudo caso-controlo, investigámos o valor prognóstico da sYB-1 em doentes com cancro da mama em estadio inicial, com ou sem recidiva à distância nos primeiros 5 anos após o diagnóstico. A proteína sYB-1 foi quantificada por ELISA em 80 amostras de soro de doentes que participaram no ensaio clínico AZURE. As amostras de soro foram obtidas aquando da randomização (início da terapêutica adjuvante). Observamos uma associação entre a positividade para sYB-1 e a não recorrência (p=0.0024), sendo que nas doentes que recidivaram a sYB-1 positiva surge associada a metastização visceral (p=0.0436). Nesta cohort, a sYB-1 parece ser um indicador de melhor prognóstico, correlacionada com maior sobrevivência global (p=0.0129) e sobrevida livre de recorrência (p=0.0099). Com base nestes resultados, e uma vez que a sYB-1 parece ser principalmente produzida por células imunitárias, a nossa hipótese é que a sYB-1 possa refletir uma resposta imunitária protetora na doença em estadio inicial. É necessária investigação futura para corroborar estes resultados e avaliar esta hipótese.

Key-words: Secreted YB-1; prognosis biomarker; breast cancer

Y box binding protein 1 (YB-1) is a member of the YBX family of transcription factors, encoded by the YBX1 gene. Several studies implicate YB-1 in carcinogenesis, tumor proliferation and progression, being a biomarker of poor prognosis. However, the role or relevance of its secreted form (sYB-1) is still unclear. In a previous work from our lab, using a retrospective cohort of patients with breast cancer and bone metastases, we found a significant correlation between detectable serum sYB-1 and faster bone disease progression. In this case-control study we investigated the prognostic role of of sYB-1 in patients with early breast cancer, with or without relapse within the first 5 years upon diagnosis. We measured by ELISA sYB-1 in 80 serum samples from patients enrolled in the AZURE clinical trial, collected at baseline (start of adjuvant treatment). Positive sYB-1 was associated with no recurrence (p=0.0024), and with visceral relapse in patients who recurred (p=0.0436). In this cohort, sYB-1 was an indicator of better prognosis, reflected in higher overall survival (p=0.0129) and relapse-free survival (p=0.0099). Based on this results, and since sYB-1 is mostly derived from immune cells we hypothesize that sYB-1 might reflect a protective immune response in early stage disease. Further investigation is needed to corroborate these results and address this hypothesis.

Alunos | **Students:** Gonçalo Félix Pimenta

Tutores | **Tutors:** David Cordeiro Sousa, Luis Abegão Pinto

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Centro de Estudos das Ciências da Visão // Vision Sciences Study Center

E-mail: gfpimenta11@gmail.com

Projeto | **Project**

2017 PEC/28

Título: O padrão de prescrição de hipotensores oculares em Portugal e a sua adequação às Normas de Orientação Clínica - PEM Study

Title: Prescription pattern of ocular hypotensive drugs in Portugal and its comparison with the European guidelines – PEM Study

Palavras-Chave:
Terapêutica médica do glaucoma; prescrição médica eletrónica; normas de orientação clínica.

Fundamento: O glaucoma é uma das principais causas irreversíveis de cegueira. Atualmente, afeta mais de 60 milhões de pessoas em todo o mundo e cerca de 2-3% da população portuguesa, representando um problema complexo para os sistemas de saúde. Uma das possíveis ferramentas para lidar com doenças mais prevalentes e exigentes consiste na aplicação de recomendações internacionais. Estas visam uma melhoria da qualidade e sustentabilidade dos cuidados prestados, beneficiando os pacientes, os profissionais e os sistemas de saúde.

Objetivos: Analisar o padrão de prescrição de hipotensores oculares em Portugal, em 2015; Discutir o uso das recomendações atuais para o tratamento de glaucoma; Identificar oportunidades de melhoria no tratamento dos doentes com glaucoma.

Métodos: Estudo transversal que incluiu todos os doentes aos quais foi prescrito, pelo menos, um fármaco hipotensor ocular, em Portugal, em 2015. Os dados foram obtidos a partir de um sistema eletrónico de prescrição comum a todo o país (PEM) usado em todos os hospitais públicos e privados desde 2014. As recomendações da Sociedade Europeia de Glaucoma e da Direção Geral de Saúde foram consultadas como referência para comparação com os dados do estudo. STATA foi usado para a análise estatística.

Resultados: Foram analisadas 833,871 prescrições referentes a 241,552 doentes (58% mulheres). Mais de metade dos doentes encontravam-se em regime de monoterapia, mas apenas 76% destes tomavam fármacos de primeira linha (análogos das prostaglandinas ou betabloqueantes). Dos doentes que realizavam terapia dupla, apenas dois terços estavam a ser medicados com combinações fixas. A prescrição recomendada de combinações fixas e de unidoses foi mais prevalente entre os profissionais de Oftalmologia do que os de Medicina Geral e Familiar. A despesa nacional relativa aos fármacos hipotensores oculares tópicos foi de 26 milhões de euros (€), contabilizando os gastos para os doentes e para o Sistema Nacional de Saúde. A taxa de prescrição por 100,000 pessoas variou entre 13,180 e 2,257, considerando as sete regiões do país.

Conclusões: A maioria das pessoas que tomam hipotensores oculares em Portugal parecem estar a ser tratadas em conformidade com as recomendações para o tratamento do glaucoma. Contudo, há um número significativo de casos em que os fármacos de primeira linha não são prescritos. É possível que haja uma menor sensibilização dos profissionais de saúde para estas recomendações, nomeadamente fora do contexto da Oftalmologia. Este estudo permitiu identificar certos aspetos no tratamento do glaucoma em Portugal que, à luz do que é recomendado, poderão ser otimizados no sentido de uma melhor e mais sustentável prática médica.

Key-words: Glaucoma medical therapy; electronic drug prescription; clinical guidelines.

Background: Glaucoma is one of the main leading causes of irreversible blindness globally. It affects more than 60 million people worldwide and 2-3% of the Portuguese population, representing a serious challenge to healthcare systems. Applying clinical guidelines into medical practice is an option when dealing with high demand diseases. They aim to improve the quality of care at a reasonable cost, providing benefits to patients, professionals and healthcare systems.

Objectives: Analyze the prescription pattern of antiglaucomatous drugs in Portugal, in 2015; Discuss the use of the current Glaucoma Guidelines; Identify opportunities for improvement on the management of glaucoma patients.

Methods: Cross-sectional study including all patients who were prescribed at least one intraocular pressure (IOP)-lowering drug in Portugal, in 2015. Data was obtained from the common electronic drug prescription system (PEM) used by all hospitals and clinics in the country since 2014. Current National and European Guidelines on Glaucoma Management were used as a reference. Statistical analyses were performed using STATA.

Results: A total of 833,871 prescriptions were provided to 241,552 patients (58% women). Over half of them were under monotherapy, but only 76% complied with first-line treatment choices (prostaglandin analogues or beta blockers). Among patients who were prescribed two IOP-lowering drugs, only two thirds adhered to the treatment strategy of using them as a fixed combination (FC). The guidelines' orientation to use FC treatments and unit-dosed agents was more likely to be followed by the ophthalmologist than the patient's general practitioner. Nationwide, this topical IOP-lowering therapy accounted for a total of 26 million euros (M€) in costs, shared between patients and the national health system. The prescription rate per 100,000 people ranged from 13,180 to 2,257 among the seven Portuguese regions.

Conclusions: Guidelines for glaucoma treatment seem to apply to most patients taking IOP-lowering medication in Portugal. However, a significant number of treated patients are not being prescribed first line drugs. Non-ophthalmologists may be less aware of the preferred practice patterns in the management of this disease. Regarding the recommendations, this study unveils certain aspects of the glaucoma treatment that could be optimized, promoting a more efficient and sustainable healthcare.

Alunos | **Students:** Maria Isabel Simões Silva

Tutores | **Tutors:** Maria Manuela Fiuza

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Clínica Universitária de Cardiologia | University Clinic of Cardiology

E-mail: miss1@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/06

Título: Doença de Fabry: Qual a importância da aurícula esquerda na deteção precoce de envolvimento cardíaco

Title: Fabry Disease: The importance of left atrium in the early detection of cardiac involvement

Palavras-Chave: Doença de Fabry; Aurícula Esquerda; *Speckle-tracking*

Fundamento: A doença de Anderson-Fabry (DAF) é uma enzimopatia lisossomal rara ligada ao cromossoma X, causada por mutações no gene α-galactosidase A (GAL) que codifica a enzima α-GAL A. Este défice altera o metabolismo de alguns glicoesfingolípidos, principalmente globotriaosilceramida (Gb3), que se acumula nos lisossomas de diferentes tipos celulares. O envolvimento cardíaco é frequente e é caracterizado por hipertrofia ventricular esquerda (HVE), o que se correlaciona com a gravidade da doença e conduz a fibrose do miocárdio e à disfunção do ventrículo esquerdo (VE). A aurícula esquerda (AE) é muito sensível às alterações da pressão de enchimento do VE e constitui um marcador robusto da gravidade e cronicidade da disfunção ventricular esquerda.

Objetivos: Investigar a importância das alterações da AE, avaliadas por ecocardiografia/Doppler e *speckle-tracking* na deteção precoce de alterações na função do VE.

Métodos: O estudo incluiu 22 doentes com doença de Fabry, 16 sem HVE e 6 com HVE. A função do miocárdio auricular e ventricular e as alterações estruturais foram analisadas por ecocardiografia convencional, Doppler e *speckle-tracking*.

Resultados: O volume da AE foi superior nos doentes com HVE. Os valores de deformação longitudinal global da AE, assim como dos segmentos lateral mediano e apical foram inferiores nos doentes com HVE. A deformação global apresentou uma correlação negativa com a HVE e o volume da AE.

Conclusões: A DAF encontra-se associada ao aumento das dimensões da AE. A diminuição da função da AE, avaliada por *speckle-tracking*, é independente da presença de HVE ou da dilatação da AE, o que sugere que o envolvimento da AE na DAF ocorra mais precocemente, e realça a possibilidade de utilização do estudo da deformação longitudinal global auricular esquerda como marcador de doença cardíaca subclínica.

Key-words: Fabry Disease; Left Atrium; Speckle-tracking

Background: Anderson-Fabry disease (AFD) is a rare X-linked lysosomal enzymopathy caused by mutations in the α-galactosidase A (GLA) gene coding for α-GAL A enzyme. This deficit alters the metabolism of some glycosphingolipids, mainly globotriaosylceramide (Gb3), that accumulate in lysosomes of many cell types. Cardiac involvement is frequent and is characterized by progressive left ventricular hypertrophy (LVH) which correlates with disease severity and leads to myocardial fibrosis and LV dysfunction. Left atrium (LA) is sensitive to changes in LV filling pressure, enabling it to be a robust marker of the severity and chronicity of LV dysfunction.

Objectives: To investigate the importance of changes in LA, evaluated by echocardiography / Doppler and speckle-tracking in the early detection of changes in LV function.

Methods: 22 patients with Fabry disease, 16 without LVH and 6 with LVH, were included in the study. Atrial and ventricular myocardial function and structural changes were analyzed by speckle-tracking, Doppler and conventional 2D echocardiography.

Results: LA volume was increased in patients with LVH. The LA global longitudinal strain values, as well as the medial and apical lateral segments were lower in patients with LVH. Global strain was negatively correlated with LVH and LA volume.

Conclusions: AFD is associated with LA enlargement. The decrease in LA function, evaluated by speckle-tracking, is independent of the presence of LVH or LA enlargement, which suggests that atrial involvement in AFD occurs early, and emphasizes the possibility of assessment of left atrial longitudinal strain as a marker of subclinical heart disease.

SESSÕES POSTERS II

Moderadores: Sérgio Dias | Vanessa Morais

20º PROGRAMA
EDUCAÇÃO PELA CIÊNCIA
Projetos de Investigação Laboratorial ou Clínica

BOLSAS CHLN/FMUL
Projetos de Investigação Clínica

Alunos | **Students:** Cristiano Emanuel Ribeiro Esteves

Tutores | **Tutors:** Simão José Teixeira da Rocha

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Carmo Fonseca Lab

E-mail: cristianoesteves@campus.ul.pt ; simaoteixeiradarocha@medicina.ulisboa.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/11

Título | Title: Estabilidade ou instabilidade da inativação do cromossoma X em células estaminais induzidas / **X-chromosome inactivation (in)stability in human female induced pluripotent stem cells**

Palavras-Chave: células estaminais pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs); Inativação do cromossoma X (XCI); XIST

As células estaminais pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs), obtidas a partir da reprogramação de células somáticas de doentes, têm muitas aplicações desde a medicina regenerativa ao uso como modelo de doenças e em estudos farmacológicos. No entanto, as hiPSCs possuem uma enorme variabilidade epigenética, por exemplo, no que respeita ao estado da inativação do cromossoma X (XCI), podendo, assim, comprometer o seu uso em investigação e a sua aplicabilidade clínica. O processo de XCI é iniciado com a expressão do RNA não codificante longo (lncRNA) XIST (X-inactive specific transcript) a partir do cromossoma X escolhido para ser inativado e induz alterações na cromatina e no silenciamento génico em todo esse cromossoma X. Neste trabalho nós pretendemos determinar o grau de instabilidade da inativação do cromossoma X em diversas linhas hiPSC femininas derivadas da mesma população inicial de células. Para isso, analisamos a expressão alélica do XIST e de alguns genes presentes no cromossoma X (SUV39, HUWE1 e ATP7A) por RT-PCR e por RNA FISH. Os nossos resultados mostraram uma grande variabilidade na expressão do XIST entre as diferentes linhas de hiPSCs, sendo que em certas linhas nenhuma expressão foi observada. Curiosamente, a análise de RNA FISH mostrou que dentro da mesma linha hiPSC existe variabilidade de expressão de célula para célula. Apesar desta variabilidade, as linhas de hiPSCs que apresentavam expressão revelaram que o XIST era expresso a partir de um único cromossoma X. Curiosamente, a análise da sequenciação de produtos de RT-PCR dos genes presentes no cromossoma X analisados mostrou que estes se encontram expressos apenas a partir de um dos dois cromossomas X em todas as linhas hiPSC. Este resultado indica que o processo de XCI parece ser estável em todos as hiPSCs, independentemente da expressão do XIST. No futuro, pretendemos analisar outros genes ligados ao cromossoma X para perceber se esta estabilidade da XCI em hiPSCs sobrevive à ausência de XIST em certas hiPSCs, se é afetada pela passagem das células in vitro e se estas células podem funcionar como modelo de doenças associadas ao X.

Key-words: Human induced pluripotent stem cells (hiPSC); X-chromosome inactivation (XCI); XIST (X-inactive specific transcript)

Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), which result from reprogramming of patient-derived somatic cells, have an enormous potential for disease modelling and drug screening, as well as, for regenerative medicine. However, hiPSCs have a huge epigenetic variability, namely, the variable state of X-chromosome inactivation (XCI), which can compromise their research and clinical potentiality. The process of XCI is initiated by the expression of the XIST (X-inactive specific transcript) long non-coding RNA from the X-chromosome triggered for silencing, which is capable to induce chromosome-wide chromatin changes and gene silencing in cis. Here, we intended determine the degree of XCI instability in independent female hiPSC lines derived from the same donor cell population. For that, we employed both a population-averaged approach (allele-specific RT-PCR) and single-cell approach (RNA FISH) to analyse the expression profile of the XIST long non-coding RNA (lncRNA), the master regulator of XCI, and of several X-linked genes (SUV39, HUWE1 and ATP7A). Our results showed a huge variability of XIST expression among the different hiPSC lines. Indeed, levels of XIST varied considerably among the different hiPSC lines, including some in which no XIST expression was observed. Interestingly, RNA FISH analysis showed that cell-to-cell variability exists within the same hiPSC line in term of XIST expression. Despite this variability, in the expressing hiPSC lines, XIST was found to be expressed from a single X-chromosome. Interestingly, allele-specific RT-PCR sequencing analysis of the X-linked genes revealed that they were expressed from only one of the two X-chromosomes in all the hiPSC lines. Therefore, XCI seems to be stable in all hiPSCs regardless of XIST expression. In the future, we will extend our analysis to other X-linked genes and understand whether the stability of XCI in hiPSCs survives XIST absence in certain hiPSC lines, if it is affected by cell passage in vitro and whether they can be used as a system for X-linked disease modelling.

Alunos | **Students:** Beatriz Lopes Draiblate

Tutores | **Tutors:** Sandra Martins, João Lacerda

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** MCFonseca´s Lab, iMM

E-mail: beatrizdraiblate@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/25

Título | Title: Correção da Depranocitose através de CRISPR /

Palavras-Chave:

Muitas terapêuticas têm sido sugeridas para ajudar a lidar com a anemia falciforme, quer através da redução e gestão das consequências da doença, ou mesmo tentando resolvê-la (transplante de medula óssea). No entanto, até à data, ainda não se desenvolveu uma abordagem terapêutica "perfeita", uma vez que há uma longa lista de espera para um transplante de medula óssea e que não é fácil escolher quem são os melhores candidatos para este procedimento. Durante os últimos meses, desenvolvi com a Prof. Sandra Martins, no Laboratório da Prof. Maria do Carmo Fonseca, vetores de CRISPR que têm como alvo o local exato onde está localizada a mutação responsável pela anemia falciforme (cromossoma humano 11, exão 3 do gene que codifica a hemoglobina, HBB), a fim de corrigir a mutação em células estaminais hematopoíeticas obtidas de pacientes com esta doença. Até agora, conseguimos construir com sucesso três vetores plasmídicos diferentes, cada um contendo o gene codificador da nuclease Cas9 em conjunto com um de três RNAs. Estes foram testados em linhas celulares de osteossarcoma humano de modo a escolher o que melhor reconhece o gene HBB humano para co-transfectá-lo em células do doente, juntamente com um vetor dador que visa corrigir nestas células a mutação causadora da anemia falciforme. Em paralelo, um vetor terapêutico contendo parte do DNA do gene HBB foi construído.

Por fim, a co-transfeção de percursores hematopoiéticos de anemia falciforme com o gRNA selecionado e o dador terapêutico do gene HBB irá permitir a avaliação da presença de eventos de recombinação homóloga mediada por CRISPR/Cas9 e a respetiva produção de proteína HBB wild-type.

Key-words:

Many treatments have been suggested to help dealing with sickle cell anemia, either by reducing and managing the consequences of the disease, or even by trying to solve it (bone marrow transplant). However, until date, there hasn't been developed a "perfect" therapeutic approach, since there is a long waiting list for a bone marrow transplant and since it's not easy to choose who are the best candidates for this procedure. During the last months, I've been developing with Prof. Sandra Martins, in Maria do Carmo Fonseca Lab, the CRISPR vectors that target the exact place where the mutation responsible for sickle cell anemia is located (human chromosome 11, HBB exon3), in order to correct it in hematopoietic stem cells obtain from patients with this disease. So far, we have been able to successfully construct three different plasmid vectors, each containing the Cas9 nuclease-coding gene together with one of three different gRNAs. Each of these plasmids was further transfected into a human osteosarcoma cell line. Genomic DNA of transfected cells was then isolated and has been used as PCR template for HBB intron 2 amplification to test for their cleavage efficiency. In parallel, a therapeutic donor vector bearing a partial HBB DNA has also being constructed.

Ultimately, co-transfection of hematopoietic precursors of sick cell anemia patients with the selected gRNA and the HBB therapeutic donor will allow to evaluate the presence of CRISPR/Cas9-mediated HR events and respective production of wild-type HBB protein.

Alunos | **Students:** José Miguel de Brito Rações Franco Frazão

Tutores | **Tutors:** Marta Sofia Alves Martins

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Unidade de Oncobiologia Translacional

E-mail: jose.frazao@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/17

Título: Estudo do SNP rs2274223 do gene PLCE1 numa população portuguesa de doentes com cancro colorrectal

Title: The Association between PLCE1 rs2274223 A>G polymorphism and Colorectal Cancer Risk

Palavras-Chave: rs2274223 - PLCε1 – CRC

Como um dos membros da família das fosfolipases C e portanto com papel importante na cadeia de sinalização celular, a Fosfolipase Cε1 (PLCε1) desempenha um papel em vários processos celulares críticos, como sejam a proliferação celular, sobrevivência, metabolismo e crescimento. Tem ainda a particularidade única de possuir um centro de ligação a proteínas G e a Ras. Para além disso está relacionada com o desenvolvimento da inflamação, que desempenha um papel importante no aparecimento de cancro colorrectal (CRC).

Neste trabalho, através de qPCR, analisámos 68 amostras de DNA de pacientes com CRC diagnosticado e 79 controlos saudáveis para o polimorfismo rs2274223 A>G na tentativa de estabelecer uma associação com CRC. Os resultados mostraram que este polimorfismo tem um efeito protector, particularmente em homozigotia mutada, em relação ao aparecimento de CRC na globalidade (GG v. AA/AG OR=0.7744, 95% CI: 0.327-1.835, p=0.6478). Foi ainda traçada uma curva de sobrevivência que revelou que a homozigotia mutada (GG) tem efeito no aumento da sobrevivência dos pacientes com CRC (p<0.0001). Estes resultados abrem a possibilidade de este polimorfismo poder ser utilizado como biomarcador para o CRC.

Key-words: rs2274223 - PLCε1 – CRC

As a member of the Phospholipase C family and thus with a role on the cellular signalization pathway, the Phospholipase Cε1 (PLCε1) plays a role in several cell-critical processes, such as proliferation, survival, metabolism and growth. It also has the unique feature of having a Ras and G protein binding domain. Moreover it plays a role in the development of inflammation, which is a known mechanism for the development of colorectal cancer (CRC).

In this work, through qPCR, we analyzed 68 DNA samples of patients with diagnosed CRC and 79 healthy controls for the polymorphism rs2274223 A>G in an attempt to establish an association with CRC. The results showed that this SNP has a protective effect regarding the global development of CRC, especially the mutated homozygous (GG) (GG v. AA/AG OR=0.7744, 95% CI: 0.327-1.835, p=0.6478). A survival curve was also drawn and it showed that the mutated homozygote (GG) has an effect on the survival of CRC. This opens the door for it being used as a possible biomarker in CRC.

Alunos | **Students:** Pedro Miguel Félix Pereira Ferreira

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

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Luís Costa Lab

E-mail: pedromiguelf@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/23

Título: Frequência alélica e plasticidade da mutação RANK R450W em ADN germinal e tumoral de doentes com cancro da mama

Title: Allelic frequency and plasticity of the RANK R450W mutation in germline and breast cancer DNA

Palavras-Chave:
Recetor Ativador do Fator Nuclear κB (RANK); mutação germinal R450W; cancro da mama

O Recetor Ativador do Fator Nuclear κB (RANK), implicado na carcinogénese e agressividade do cancro da mama (CM), é também o principal regulador da remodelação óssea fisiológica e patológica. Previamente identificámos no gene RANK um polimorfismo de nucleótido único (SNP), rs34945627, com uma elevada frequência alélica de 12,5% (9/72) em doentes com CM, comparativamente com 1,2% (1/80) no grupo de controlo (p=0,005). Observou-se, de igual modo, uma associação com menor sobrevida livre de doença (log-rank p=0.039, HR ajustado 2.29, 95% CI 1.04–5.08, p=0.041), e sobrevida global (log-rank p=0.019, HR ajustado 4.32, 95% CI 1.55–12.04, p=0.005).

Face a este resultado decidimos validar a frequência alélica deste SNP numa coorte independente do Hospital Universitário de Oslo, que inclui ADN germinal de 1506 doentes com CM. O SNP rs34945627 foi genotipado por PCR específico para alelos (TaqMan®), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados inicialmente obtidos indicaram uma baixa sensibilidade do método, refletida no baixo sinal de amplificação. Por este motivo incluímos ADN de plasmídeos como controlo positivo para os três genótipos possíveis. De forma a podermos comparar eficazmente o sinal de amplificação do ADN genómico e dos plasmídeos, foi optimizada a reação de genotipagem, que passa a incluir um pré-PCR de 10 ciclos (1min a 95º, 30 s a 59º, 1 min a 72º), utilizando 5 ng de ADN genómico e primers específicos para a região a amplificar (Fw: 5'-GGCACATGTGTAGGAGGTGGTCCCTACG-3'; Rv: 5'-CCCCCTGAAGAAGAAGCCAG-3').

A coorte de Oslo inclui 1506 mulheres, diagnosticadas com CM entre 1995 e 2011, e seguidas no Hospital Universitário de Oslo. A mediana de idades ao diagnóstico é de 57,5 anos (IQR: 49,2-67,2), com um follow up mediano de 4 anos (IQR: 3-8). De acordo com a informação patológica disponível, a maior parte dos tumores eram invasivos (67,99%), de tipo histológico ductal (54,45%), com um tamanho mediano de 18 mm de maior eixo (IQR: 12,0-25,0). 14,8% dos tumores foram diagnosticados em grau 1, 32,87% em grau 2, e 24,04% em grau 3.

Até esta data foram genotipadas 563 (37,38%) amostras, sendo todas wild type (genótipo CC) para o SNP rs34945627. A genotipagem das restantes amostras encontra-se em curso, por forma a determinar a frequência alélica do SNP na coorte. Os dados obtidos sugerem no entanto que a frequência alélica do SNP rs34945627 em mulheres com CM será inferior à esperada. É, portanto, necessário reavaliar a coorte inicial (de descoberta), com método otimizado e por sequenciação de Sanger, de modo a determinar com clareza os genótipos das doentes.

Key-words:
Receptor Activator of Nuclear Factor κB (RANK); R450W germline mutation; breast cancer

The Receptor Activator of Nuclear Factor κB (RANK), implicated in breast cancer (BC) carcinogenesis and aggressiveness, is also the major regulator of bone remodeling in bone metastasis. In the RANK gene, a germline single nucleotide polymorphism (SNP), rs34945627, was identified at high allelic frequency (12.5% (9/72) in BC patients, against 1.2% (1/80) in healthy controls; p=0.005), and was associated with both reduced disease-free survival (log-rank p=0.039, adjusted HR 2.29, 95% CI 1.04–5.08, p=0.041), and overall survival (log-rank p=0.019, adjusted HR 4.32, 95% CI 1.55–12.04, p=0.005)

Such finding prompted an effort to validate these results in an independent cohort, so we aimed to genotype this SNP in germinal DNA from a cohort of 1,506 BC patients from Oslo University Hospital, Norway. SNP was genotyped using the respective TaqMan® SNP Genotyping Assay, according to the manufacturer's instructions. Since our initial results indicated a low sensitivity of the assay, reflected in the amplification signal, we introduced plasmid DNA as positive control for wild type and mutated SNP. In order to better compare the amplification signal from plasmid and genomic DNA, an optimization of the amplification reaction was performed, including a pre-PCR reaction of 10 cycles (1 min at 95º, 30 s at 59º, 1 min at 72º), using 5 ng of gDNA and sequence specific primers (Fw: 5'-GGCACATGTGTAGGAGGTGGTCCCTACG-3'; RV: 5'-CCCCCTGAAGAAGAAGCCAG-3').

The Oslo cohort includes 1,506 female BC patients, that were diagnosed with BC between 1995 and 2011 and followed at the Oslo University Hospital. Median age at diagnosis was of 57.50 years (IQR:49.2-67.2), and median follow-up was four years (IQR:3-8).

According to available pathologic information, the majority of tumors were invasive (67.99%), of ductal histologic type (54.45%), and median tumor size was 18.0 mm (IQR: 12.0-25.0). The cohort includes 14.8% of tumors diagnosed in grade 1, 32.87% in grade 2, 24.04% and in grade 3. At this moment, 563 (37.38%) samples were already genotyped, and all are wild-type (CC genotype). Further analysis is ongoing at this stage, in order to complete the characterization of SNP allelic frequency on the entire cohort.

The use of a more sensitive genotyping method suggests at this stage that the SNP allelic frequency will be below the expected percentage. Is is therefore necessary to re-evaluate the initial (discovery) cohort, with the optimized assay and by Sanger sequencing, in order to clearly determine the genotypes of the putative affected patients.

Alunos | **Students:** Catarina Alves do Vale

Tutores | **Tutors:** Bruno Miguel Bernardes de Jesus, Carla Marina Pereira Gomes

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

E-mail: cvale@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/29

Título | Title: Desvendando o papel do RNA não codificante longo NORAD no cancro da mama // Unravelling the role of the long noncoding RNA NORAD in breast cancer

Palavras-Chave: cancro da mama; RNAs não codificantes longos; NORAD.

Fundamento: O Projeto Genoma Humano e avanços posteriores em sequenciação revolucionaram a visão acerca da complexidade do transcriptoma. De facto, apenas ≈2% do genoma codifica proteínas, contrastando com a fracção (>75%) que é activamente transcrita em RNAs não codificantes.

Neste trabalho, procurámos investigar o papel que NORAD – RNA não codificante longo recentemente descrito – desempenha em cancro da mama. Apesar da evidência de que promove a proliferação celular e a estabilidade cromossómica, o seu verdadeiro papel no desenvolvimento tumoral permanece ainda por desvendar.

Objetivos: Explorar o potencial de NORAD na terapia dirigida para cancro da mama é o principal propósito deste projecto, com base em dois objectivos complementares: 1. Testar se a expressão de NORAD é específica de subgrupo e/ou correlacionada com a agressividade tumoral. 2. Avaliar se a diminuição dos níveis de NORAD afecta a sensibilidade de linhas celulares de cancro da mama ao tratamento com o citotóxico doxorrubicina.

Métodos: A expressão de NORAD foi avaliada através de PCR quantitativo em diversas linhas celulares de cancro da mama. A plataforma *KM Plotter Online Tool* foi utilizada para explorar a correlação entre a expressão de NORAD em amostras tumorais e a evolução clínica dos pacientes.

Foram utilizados os oligonucleótidos *antisense* LNA™ GapmeRs para a downregulation de NORAD. A viabilidade celular foi medida através do ensaio da resazurina, após a *downregulation* e a incubação com doxorrubicina. A hibridação *in situ* por fluorescência de molécula única foi efectuada com sondas Stellaris®.

Resultados: A análise dos níveis de NORAD em linhas celulares de cancro da mama mostrou que o subtipo mais agressivo exibia níveis de expressão superiores aos apresentados pelas células mais indolentes e pelas não tumorais. Adicionalmente, observou-se, através da *KM Plotter Online Tool*, que uma elevada contagem de transcritos NORAD se encontrava associada a menor taxa de sobrevivência livre de recidiva de doença. No entanto, esta correlação era válida unicamente para o subtipo basal.

Desta forma, avaliou-se se os níveis de NORAD poderiam afectar a sensibilidade tumoral à quimioterapia. Resultados preliminares sugerem que a *downregulation* de NORAD em linhas celulares do subtipo basal/triplo-negativo aumenta a sensibilidade à doxorubicina.

Através de hibridação *in situ* por fluorescência de molécula única, foi ainda possível visualizar os transcritos NORAD pela primeira vez em linhas celulares de cancro da mama, tendo sido detectada uma distribuição predominantemente citosólica.

Conclusões: O nosso projecto abre caminho para novas investigações referentes ao contributo deste promissor RNA não codificante longo em cancro da mama do subtipo basal. A comprovar-se a sinergia entre a terapêutica com citotóxicos e a *downregulation* de NORAD, o *targeting* selectivo de NORAD utilizando estratégias *in vivo* poderá permitir a redução da dose de fármaco necessária para travar o desenvolvimento tumoral.

Key-words: breast cancer; long noncoding RNAs; NORAD.

Background: The Human Genome Project and posterior improvements in sequencing technology provided transformational insights into the complexity of the transcriptome. Indeed, only approximately 2% of the genome is believed to code for proteins, whereas at least 75% is actively transcribed into noncoding RNAs.

In this study, we aimed to explore the role of the recently described long noncoding RNA NORAD in breast cancer. Notwithstanding the previous evidence that NORAD promotes cell proliferation and chromosomal stability, its true involvement in tumourigenesis remains unclear.

Objectives: The main goal of this project is to explore the potential role of NORAD in the targeted therapy of breast cancer. With focus on two complementary perspectives, our objectives were: 1. To assess whether NORAD expression is subtype-specific and/or correlated with tumor aggressiveness. 2. To evaluate if NORAD downregulation may affect the sensitivity of breast cancer cell lines to doxorubicin - a cytotoxic drug used in the clinical setting.

Methods: NORAD expression was analysed through quantitative PCR in several breast cell lines (tumourigenic and non-tumourigenic). The KM Plotter Online Tool was used to explore the correlation between NORAD expression in tumour samples and patients' clinical outcome.

NORAD downregulation was effectively performed using the antisense oligonucleotides LNA™ GapmeRs. After downregulating NORAD and incubating cells with doxorubicin, cellular viability was assessed by performing the resazurin assay. Single-molecule RNA fluorescence in situ hybridization was executed using Stellaris® FISH Probes.

Results: The analysis of NORAD expression in several breast cancer cell lines has shown that the most aggressive subtype exhibited higher NORAD levels, in contrast to the most indolent and non-tumourigenic cell lines, which presented with the lowest levels.

Motivated by the aforementioned in vitro results, we found out, using the KM Plotter Online Tool, that high intratumour NORAD levels were associated to poor relapse-free survival, but exclusively in the basal-like subtype.

Given the correlation between expression levels and survival, we decided to study the effect of combining NORAD inhibition and drugs, topic which had never been addressed before. Preliminary results suggest that NORAD downregulation increases the sensitivity of basal-like/triple-negative breast cells to doxorubicin.

Moreover, in this study, NORAD transcripts were visualized, for the first time, in breast cells by single-molecule fluorescence in situ hybridization, in which a predominantly cytosolic distribution has been detected.

Conclusions: The present investigation paves the way for future work concerning this promising RNA in basal-like breast cancer. If proven to be synergistic with chemotherapy, the selective targeting of NORAD using in vivo downregulation strategies may contribute to reduce the drug dosage required to hinder tumour development.

Alunos | **Students:** Inês Hartley Alexandre

Tutores | **Tutors:** Sérgio Dias, Sandrina Nóbrega Pereira

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit: Sérgio Dias Lab, IMM**

E-mail: sergiodias@medicina.ulisboa.pt; sandrina.pereira@fm.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/07

Título: O impacto do PGC-1α e metabolismo mitocondrial em cancro de mama com fenótipo agressivo induzido por hipercolestrolemia

Title: The impact of PGC-1α and mitochondrial metabolism in breast cancer aggressive phenotype induced by hypercholesterolemia

Palavras-Chave: PGC-1α, metabolismo, cancro da mama

Introdução: Em cancro da mama, foi demonstrado que mudanças profundas no metabolismo lipídico particularmente na oxidação de ácidos gordos influenciam a sobrevivência de células cancerígenas, o potencial tumorigénico e a aquisição de resistência a quimioterapia e existem provas que subpopulações específicas de células cancerígenas (metastáticas e resistentes a quimioterapia) dependem mais exclusivamente da respiração mitocondrial, no Sérgio Dias Lab, já foi mostrado que exposição a colesterol LDL promove nas células de cancro de mama negativas para recetores hormonais (TNBC) - da linha MDA-MB-231- a proliferação, acompanhada de um aumento da massa mitocondrial e adoção preferencial de respiração mitocondrial. O impacto da hipercolesterolémia na resposta das células TNBC à quimioterapia, especificamente com Taxol, mantém-se pouco claro.

Objetivo: O objetivo deste estudo é perceber o papel do PGC-1α, o principal fator que controla a biogénese mitocondrial, na reprogramação metabólica induzida in vitro e na resposta das células TNBC, com recurso a tecnologia de knockdown da expressão génica.

Resultados: As células da linha MDA-MB-231 com depleção de PGC-1α apresentam um decréscimo da expressão de PGC-1α e dos componentes OXPHOS: ATP5g1 e NDUFB5, o que foi mostrado previamente que era induzido por exposição a LDL, e diminuição do conteúdo de mtDNA. Além disso, as células com depleção de PGC-1α têm uma maior proliferação que as do grupo controlo scramble (tanto na presença como na ausência de LDL), no entanto, o knockdown do PGC-1α não aboliu a vantagem dada pelo LDL na capacidade proliferativa. Nos ensaio de cicatrização onde se pretende avaliar a migração e movimento celulares, obtivemos resultados preliminares que sugerem que a depleção do PGC-1α produz uma redução da capacidade migratória, ainda assim a exposição a LDL aumentou a cicatrização e em células com depleção de PGC-1α. Finalmente, outros resultados preliminares observados em células MDA-MB-231 tratadas com Taxol e LDL, indicam que esta combinação leva a um decréscimo da viabilidade celular e um aumento da morte celular (conforme observado com coloração com AnnexinV; 7AAD) e a depleção de PGC-1α não afeta significativamente este efeito.

Conclusões: Até ao momento, os resultados sugerem que a hipercolestrolémia aumenta a resposta ao Taxol por parte de células TNBC MDA-MB-231. Além disso, a biogénese mitocondrial mediada por PGC-1α impacta as capacidades proliferativa e migratória (com aumento da proliferação e diminuição da migração), no entanto não altera significativamente a agressividade induzida por LDL ou a resposta ao tratamento com Taxol, sugerindo que outros eventos mitocondriais (dinâmica mitocondrial e/ou mitofagia) possam ser relevantes.

Key-words: PGC-1α, metabolism, breast cancer

Introduction: In breast cancer, profound changes in lipid metabolism, particularly through fatty acid oxidation, have been shown to influence cancer cell survival, tumorigenic potential and acquisition of resistance to chemotherapy and there is evidence that critical subpopulations of cancer cells (metastatic and chemotherapy-resistant) rely more exclusively in mitochondrial respiration for cellular energetics. In Sérgio Dias Lab, we have shown that LDL exposure promotes triple negative breast cancer (TNBC) cells (MDA-MB-231) proliferation, migration and loss of adhesion in vitro and is accompanied by increased mitochondrial mass and a preferential adoption of mitochondrial respiration. Whether hypercholesterolemia also impacts the response of TNBC cells chemotherapy treatment, particularly Taxol, remains elusive.

Objective: The aim of this study is to understand the requirement of PGC-1α , the main factor controlling mitochondrial biogenesis, in the metabolic reprogramming induced by hypercholesterolemia in vitro and in the response to Taxol, using gene expression knockdown technology.

Results: PGC-1α depleted MDA-MB-231 cells present decreased expression of PGC-1α and the OXPHOS components ATP5g1 and NDUFB5, previously shown in the Lab to be induced by LDL-exposure, and decreased mtDNA content. Moreover, PGC-1α depleted cells have higher proliferation levels than the scramble control group (both in the absence or presence of LDL), however PGC-1α knockdown did not abolish the proliferative advantage given by LDL exposure. In the wound-healing assay, preliminary results suggest that PGC-1α depletion produces an overall reduction of the migratory capacity, yet LDL-exposure still induces increase wound closure in PGC-1α depleted cells. Finally, we have preliminary observations that MDA-MB-231 cells treated with Taxol in combination LDL have decreased cell viability and increased cell death (as evaluated by AnnexinV; 7AAD staining) and depletion of PGC-1α does not significantly alter this effect.

Conclusions: So far, our results suggest that hypercholesterolemia increases the response of TNBC MDA-MD-231 cells to Taxol treatment. Moreover, PGC-1α–mediated mitochondrial biogenesis impacts the proliferative and migratory capacity of TNBC MDA-MB-231 cells (with increased proliferation and decreased migration) however, does no significantly alter the increase aggressiveness induced by LDL exposure or the response to Taxol treatment; suggesting that other mitochondrial events (mitochondrial dynamics and/or mitopahagy) may be relevant.

Alunos | **Students:** Tatiana Duque

Tutores | **Tutors: Ana Rita Fragoso**

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** João T. Barata Lab

E-mail: tatianascduque@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/09

Título | **Title:** Definição de um padrão de expressão de microRNAs específico de T-ALL | Definition of a T-ALL-specific microRNA expression profile

Palavras-Chave: expressão de microRNAs; LLA-T

A leucemia linfoblástica aguda das células T (LLA-T) é uma neoplasia hematológica causada por alterações genéticas que contribuem para a transformação maligna de células estaminais ou progenitoras hematopoiéticas. Apesar dos avanços a nível terapêutico, os doentes com LLA-T são tratados com quimioterapia que, para além de tóxica, tem efeitos adversos a longo prazo. Consequentemente, é essencial desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes e específicas.

Um dos projetos a decorrer no laboratório JBarata consiste no desenvolvimento de um sistema de deteção de microRNAs que explora as diferenças entre as células leucémicas e as células normais relativamente ao seu padrão de expressão de microRNAs para: 1) identificar especificamente as células leucémicas e 2) regular a expressão de um agente terapêutico nas células malignas. Ou seja, uma correspondência entre o padrão específico de microRNAs dentro de uma célula e o detetor-de-microRNAs identificará a célula como maligna e induzirá a sua morte através da ativação de um gene terapêutico, presente no detetor-de-microRNAs

Assim, o principal objetivo deste projeto é definir um padrão de expressão de microRNAs específico de células de LLA-T. Para tal, analisámos a expressão de 12 microRNAs (miR-376a, miR-662, miR-128a, miR-149, miR-153, miR-195, miR-19b, miR-29a, miR-32, miR-320, mirR33 e miR-7) previamente identificados através da análise bioinformática de dados públicos de expressão de microRNAs em células de LLA-T e células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas.

Começámos por estabelecer culturas de linhas celulares de LLA-T (Jurkat; DND4.1; MOLT4; CEM; SUP-T1, HPB-ALL, TALL-1, P12 e Loucy) e de linhas celulares não-LLA-T (293T- U2OS; A549; MDA231; HCT-116; ACHN; D458; CaCO2 e A498), a fim de recolher células para extração de RNA. De seguida, extraímos RNA das diferentes linhas celulares usando o reagente TRIzol e utilizámos os TaqMan MicroRNA Assays da Applied Biosystems para determinar a expressão relativa de cada microRNA. Foi usado um primer específico para cada microRNA para proceder à transcrição reversa e uma sonda específica para cada microRNA para realizar o PCR quantitativo.

De um modo geral, não encontrámos diferenças nos níveis de expressão de microRNAs: miR-19b, miR-7, miR-320, miR-195, miR-33 e miR-32 em células de LLA-T e não-LLA-T. Por outro lado, detetámos os miR-128 e miR-153 sobre-expressos em células de LLA-T e os miR-149 e miR-29a sub-expressos em células de LLA-T em comparação com células não-LLA-T. Por fim, no que diz respeito aos níveis de expressão de miR-662 e miR-376a, os resultados não foram consistentes, sendo necessária posterior validação.

Em suma, do conjunto de microRNAs analisados e previstos como específicos de células de LLA-T, identificámos os miR-128 e miR-153 como estando sobre-expressos e os miR-149 e miR-29a sub-expressos. Estes microRNAs podem agora ser utilizados para contruir detetores-de-microRNAs.

Key-words: microRNA expression; T-ALL

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a malignancy of white blood cells, caused by genetic alterations that contribute to the leukemic transformation of hematopoietic stem cells or their committed progenitors. Despite the breakthroughs, leukemia patients are still treated with high-dose multi-agent chemotherapy. Not only is the therapy toxic, but it also has long-term side effects. Therefore, it is imperative to develop more effective and selective therapies against cancer.

One of the projects being developed at the JBarata lab aims to take advantage of leukemia-specific microRNA expression profiles to create a microRNA-detector system that selectively delivers a therapeutic gene to T-ALL cells. In concrete, this microRNA-detector system explores the differences between leukemia and normal cells regarding their microRNA expression pattern to: 1) specifically identify leukemia cells and 2) induce the expression of a therapeutic agent selectively in the malignant cells.

The main goal of this project is to define a microRNA expression profile specific of human T-ALL cells. To this end we have analysed the expression of twelve microRNAs (miR-376a, miR-662, miR-128a, miR-149, miR-153, miR-195, miR-19b, miR-29a, miR-32, miR-320, miR-33 and miR-7) predicted to be specific of T-ALL cells. This list of microRNAs has been established by bioinformatics analysis of publicly available microRNA array datasets obtained from T-ALL cells and hematopoietic and non-hematopoietic cells.

First, we cultured T-ALL cell lines (Jurkat; DND4.1; MOLT4; CEM; SUP-T1, HPB-ALL, TALL-1, P12 and Loucy) corresponding to different differentiation stages and non-T-ALL cell lines (such as 293T- U2OS; A549; MDA231; HCT-116; ACHN; D458; CaCO2 and A498) to collect cells for RNA extraction. Next, we extracted RNA from the different cell lines using TRIzol reagent and used Applied Biosystems TaqMan MicroRNA Assays to determine the relative expression levels of each microRNA. These assays utilize a microRNA-specific primer for reverse-transcription, followed by real-time PCR with a microRNA-specific probe.

Overall, we found no differences in the expression levels of miR-19b, miR-7, miR-320, miR-195, miR-33 and miR-32 in T-ALL and in non-T-ALL cell lines. On the other hand, and as predicted, we found miR-128 and miR-153 expression up-regulated in T-ALL cells. In contrast, the expression of miR-149 and miR-29a was lower in T-ALL cells, in comparison with non-T-ALL cell lines. Finally, and in what concerns the expression levels of miR-662 and miR-376a, the results obtained were not consistent and need further validation.

In sum, of the set of microRNAs analysed and predicted to be specific of T-ALL cells, we have found miR-128 and miR-153 up-regulated and miR-149 and miR-29a down-regulated. Importantly, these microRNAs can now be used to design the microRNA-detectors.

SESSÕES POSTERS III

Moderadores: Karine Serre | Rita Fragoso

20º PROGRAMA
EDUCAÇÃO PELA CIÊNCIA
Projetos de Investigação Laboratorial ou Clínica

BOLSAS CHLN/FMUL
Projetos de Investigação Clínica

Alunos | **Students:** Beatriz Silvestre Vieira de Sá
Tutores | **Tutors:** Julie Ribot; André M. Graça
Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit: Bruno Silva-Santos Lab**
E-mail: beatriz.sa@campus.ul.pt

Projeto | **Project**
2017 PEC/03

Título: Evolução do perfil de mediadores inflamatórios em recém-nascidos com encefalopatia hipóxico-isquémica tratados com hipotermia induzida

Title: Evolution of the inflammatory mediators' profile in newborns with hypoxic-ischaemic encephalopathy treated with induced hypothermia

Palavras-Chave: Encefalopatia hipóxico-isquémica; linfócitos T; interleucina-17

Fundamento: A neuroinflamação tem sido apontada como um factor crucial na fisiopatologia da lesão cerebral em recém-nascidos com encefalopatia hipóxico-isquémica (EHI), correlacionando-se com a gravidade da doença e pior prognóstico. No entanto, este processo também pode contribuir para a regeneração neuronal. Assim, o aparente duplo papel do sistema imune na fisiopatologia da EHI carece de mais estudos.

Objetivos: Propomo-nos caracterizar a evolução do perfil imuno-inflamatório no sangue periférico de recém-nascidos com EHI submetidos a hipotermia e correlacioná-lo com o prognóstico.

Métodos: Utilizando análise de citometria de fluxo, caracterizámos o perfil de leucócitos e níveis de citocinas inflamatórias (TNF-α, IL-17, IFN-γ) no sangue periférico de 6 recém-nascidos com EHI às 0, 12, 24 e 72 horas de tratamento com hipotermia. Os resultados obtidos foram comparados com o sangue do cordão umbilical de recém-nascidos saudáveis (n= 13) e correlacionados com o prognóstico.

Resultados: Os nossos resultados revelam elevação da percentagem média de células produtoras de TNF-α, IFN-γ e IL-17 (maioritariamente neutrófilos e subtipos de células T ativadas) nas amostras de EHI colhidas às 0h, comparativamente com as amostras de controlo. . Observámos que elevações de TNF-a geralmente se associavam a pior prognóstico, sendo que não foi evidenciada correlação entre os valores de IFN-γ e um prognóstico específico. Verificamos ainda que picos precoces (0-24h) de IL-17 foram correlacionados com bom prognóstico, enquanto picos tardios (48-72h) da mesma citocina foram associados a mau prognóstico.

Conclusão: Globalmente, os nossos dados salientam importantes mediadores imunológicos e populações celulares associadas à fisiopatologia da EHI como candidatos como marcadores de prognóstico ou com potencial terapêutico que poderão ser considerados em futuras investigações clínicas.

Key-words: Hypoxic-ischaemic encephalopathy; T lymphocytes; interleukin-17

Background: Neuroinflammation has been pointed as a crucial factor in the pathophysiology of brain injury in newborns with hypoxic-ischaemic encephalopathy (HIE), and associated with the severity of the disease and worse prognosis. However, this process can also contribute to neuronal regeneration. Therefore, the apparent dual role that the immune system plays in HIE requires further investigation.

Objectives: We aim to characterise the evolution of the immune and inflammatory profile in the peripheral blood of newborns with HIE treated with hypothermia and correlate it with prognosis.

Methods: Using flow cytometry analysis, we characterised the leucocyte profile and circulating cytokine levels (TNF-α, IL-17, IFN-γ) in the peripheral blood of six newborns with HIE at 0, 12, 24 and 72 hours of treatment with hypothermia. These results where compared with cord blood from healthy newborns (n= 13) and correlated with prognosis.

Results: Our results highlight increased average percentages of TNF-α, IFN-γ and IL-17 (mainly neutrophils and activated T cell subsets) in EHI samples collected at 0h when compared with control samples. We observed that TNF-α generally predicted a bad prognosis, while IFN-γ did not associate with any specific outcome. We also verified that early (0-24h) peaks of IL-17 were linked to a good prognosis whereas late peaks of this same cytokine rather reflected a bad prognosis.

Conclusion: Altogether, our data highlight important immune mediators and cell populations linked to EHI pathophysiology as candidates for prognostic outcome and therapeutic potential that could be considered for the design of future clinical research.

Alunos | **Students:** Gonçalo Pimenta Pedro Palmeirim

Tutores | **Tutors:** Bruno Miguel de Carvalho e Silva Santos, Pedro Henrique Papotto Rosa

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Silva-Santos Lab, IMM

E-mail: goncalopimentapp@gmail.com

Projeto | **Project**

2017 PEC/13

Título | **Title:** Controlo de dano pulmonar pelas células T γδ | Damage control by γδ T cells during lung injury

Palavras-Chave: Células T γδ ; Pulmões; IFN-γ

Mais de 30 anos após a sua descoberta, as células T γδ continuam a ser uma população de linfócitos pouco compreendida. Ao contrário dos linfócitos T αβ, esses linfócitos, saem do timo como células efetoras maturas, sendo assim, capazes de responder rapidamente a estímulos ambientais, principalmente, através da produção de IFN-γ ou IL-17A. Embora não sejam muito frequentes no sangue e nos nodos linfáticos, as células T γδ podem representar a maioria das células T residentes nos tecidos. Enquanto as células T γδ residentes na pele e no intestino tenham sido extensivamente estudadas, tal como o seu papel na manutenção da homeostase e na resposta imune local, o papel destas células, durante a inflamação pulmonar, contínua controverso, existindo, na literatura, relatos de atividade pró e anti-inflamatória por parte das mesmas. Com base em resultados preliminares do nosso grupo, pomos a hipótese de que as células T γδ possuam um papel protetor, conferindo uma proteção do pulmão, em caso de dano tecidual. Para averiguar o papel das células T γδ em caso de inflamação pulmonar, usámos um modelo de infeção de murganhos, usando o parasita *Nippostrongylus brasiliensis*. Resumidamente, injetámos murganhos controlo (WT) e deficientes em células T γδ (TCRδ$^{-/-}$), com 450 larvas L3 por via subcutânea. Os animais foram sacrificados durante o pico de dano pulmonar (dia 2 pós infeção; p.i.) ou durante o pico de inflamação celular (dia 6 p.i.). O dano do tecido pulmonar foi quantificado através do cálculo do índice de linear mean intercept (LMI) em secções preservadas em parafinas e coradas com hematoxilina-eosina. Em paralelo, o infiltrado no tecido pulmonar foi analisado por citometria de fluxo. Ainda, a quantidade de parasitas no órgão alvo foi determinada pela contagem de larvas viáveis. A análise histológica dos pulmões infetados com *N. brasiliensis*, mostrou que murganhos TCRδ$^{-/-}$ apresentavam um aumento do espaço alveolar, que traduziu-se num índice de LMI significativamente superior, quando comparados com os WT, tanto nos dias 2 e 6 p.i. A quantidade de parasitas, contudo, não apresentou diferenças. Embora apresentassem mais dano, os murganhos TCRδ$^{-/-}$ não demonstravam um aumento nas populações de células inflamatórias nos pulmões, nomeadamente, ILCs tipo 2, neutrófilos e eosinófilos, quando comparado com os WT. Contudo, os monócitos Ly6C^{+} estavam diminuidos nos TCRδ$^{-/-}$ nos dias 2 e 6 p.i. É de salientar que, as propriedades protetoras das células T γδ é independente do IFN-γ e da IL-17A, sendo que, as análises histológicas dos murganhos IFN-γ$^{-/-}$ e IL-17A$^{-/-}$ não demonstram diferenças na lesão do tecido, quando comparados com os WT. Concluindo, os nossos resultados sugerem que as células T γδ têm um papel fundamental na manutenção da integridade do tecido, após inflamação, mas não para o controlo da infeção de *N. brasiliensis*. Porém, esta função não é dependente da produção das citocinas IFN-T γ e IL-17A, mas pode estar dependente do recrutamento de monócitos Ly6C^{+}. No entanto, mais estudos são necessários para desvendar o mecanismo na base do papel protetor das células T γδ.

Key-words: γδ T cells; lungs; IFN-γ

More than 30 years after their discovery, γδ T cells are still a very puzzling population of lymphocytes. Unlike their αβ counterparts, these innate-like lymphocytes, exit the thymus with fully mature effector programs. Thus, being able to readily respond to environmental cues mainly through the production of IFN-γ or IL-17A. Although not very frequent among lymphocytes in the blood and in lymph nodes, γδ T cells can represent the majority of tissue-resident T cells. Whilst skin- and gut-resident γδ T cells have been thoroughly studied, and their role in mounting local immune responses and maintaining the homeostasis of these tissues is well known, the role of γδ T cells during pulmonary inflammation remains controversial, with reports in the literature attributing both pro- and anti-inflammatory properties for these cells. Based on preliminary results from our group, we hypothesized that γδ T cells have a protective role in controlling tissue damage upon lung injury. In order to assess the role of γδ T cells during pulmonary inflammation, we used a well-established model of helminth infection in rodents with the parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. Briefly, wild-type (WT) and γδ T cell-deficient (TCRd$^{-/-}$) mice were injected subcutaneously with 450 L3 larvae, and then sacrificed during the peak of pulmonary damage (day 2 post-infection; p.i.) or during the peak of cellular inflammation (day 6 p.i.). Pulmonary tissue damage was quantified by calculating the linear mean intercept (LMI) index of hematoxilin-eosin stained paraffin-preserved sections. In parallel, pulmonary tissue infiltrates were analyzed by flow cytometry. Also, worm burden was determined by counting viable larvae present in the target organ. Histological analysis of *N. brasiliensis*-infected lungs, showed that TCRδ$^{-/-}$ mice presented enlarged alveolar spaces, which translated in a significant higher LMI index, when compared with their WT counterparts, both on days 2 and 6 p.i. The worm burden, however, was similar between both strains. Although presenting more tissue damage, TCRδ$^{-/-}$ mice did not show an increase in inflammatory immune cell populations in their lungs, such as type-2 ILCs, neutrophils and eosinophils, when compared to their WT counterparts; Ly6C+ monocytes, however, were decreased in TCRδ$^{-/-}$ both in days 2 and 6 p.i. Importantly, γδ T cell protective properties are independent of both IFN-γ and IL-17A, as histological analysis of IFN-γ$^{-/-}$ and IL-17A$^{-/-}$ mice showed no differences in tissue damage, when compared to WT mice. In conclusion, our results suggest that γδ T cells are critical for maintaining tissue integrity upon inflammation, but not for the control of *N. brasiliensis* infection. This function, however, does not rely on the production of the cytokines IFN-γ and IL-17A, but might be dependent on the recruitment of Ly6C^{+} monocytes. Nevertheless, more studies are necessary to unravel the mechanisms behind the tissue protective role of γδ T cells.

Alunos | **Students:** Ana Filipa Canha Pereira; Ana Paula Lopes Martins
Tutores | **Tutors:** Leonor Saúde
Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** LSaúde Lab
E-mail: anacanha@campus.ul.pt; anaplmartins@campus.ul.pt

Projeto | **Project**
2017 PEC/18
2017 PEC/14

Título | **Title:** O impacto da inflamação crónica na regeneração da medula espinhal | The impact of chronic inflammation in spinal cord regeneration

Palavras-Chave: lesão renal aguda; cirurgia cardíaca; biomarcadores tubulares

Lesões na medula espinhal afetam 58 novos pacientes por milhão, em Portugal. Como esta patologia prejudica as funções motoras e sensoriais permanentemente, tem um grande impacto sobre o paciente a nível físico, psicológico e social. Nos mamíferos, esta lesão leva a cicatrização de modo a manter a integridade do tecido. Contudo, no peixe zebra a medula espinhal regenera o tecido perdido, estrutural e funcionalmente, sem ocorrer formação de cicatriz.

Quando há lesão da medula espinhal, é perdida a barreira hemato-espinhal e é ativado o Sistema Imunitário, conduzindo a uma acumulação de microglia ativada e leucócitos. Assim, a inflamação é um ponto-chave na modulação do microambiente no local da lesão.

No peixe zebra, a inflamação nunca se torna crónica e foi também demonstrado que uma inflamação provisória é benéfica num modelo de lesão do cérebro, mas o mesmo ainda não se sabe para a medula espinhal. No ratinho, a situação é diferente, pois existe uma inflamação persistente por longos períodos com formação de cicatriz e morte celular.

Colocámos a hipótese de que aumentar o período inflamatório terá um impacto negativo na regeneração no modelo de lesão da medula espinhal em peixes zebra. Assim, o nosso objetivo foi a indução de uma inflamação crónica e avaliação da regeneração.

A transecção da medula espinhal de larvas de peixe zebra ocorreu aos 5 dias pós fertilização, ao nível do poro anal. A dinâmica da resposta inflamatória foi estudada seguindo o recrutamento de neutrófilos para o local de lesão, utilizando larvas transgénicas Tg (mpx:EGFP). Vimos que o recrutamento máximo ocorre entre as 5-7 horas após lesão (hpl) e que está resolvida às 96 hpl.

Analisámos também larvas de uma linha transgénica de macrófagos, Tg (mpeg:EGFP) – cedidas pela Fish Facility da Champalimaud. Observámos que o recrutamento de macrófagos para o local da lesão era variável entre larvas, apesar disso conseguimos descrever a persistência destas células fagocíticas entre as 24-48 hpl.

Para induzir uma inflamação estéril, utilizamos Zymosan A (Sigma) em água e em injeções intramusculares. Uma vez que o Zymosan A não se dissolve em água, tivemos de recorrer às injeções como modo de administração. A relação entre a injeção da droga pró-inflamatória e a extensão da resposta inflamatória era variável entre larvas. Apesar disso, o resultado final é que foi possível induzir inflamação. Como tal, continuámos o estudo aplicando a injeção da droga e a transeção simultaneamente. As larvas foram analisadas após 22 horas onde observámos dois focos diferentes de inflamação, um no local da lesão e o outro no da injeção. Como não conseguimos induzir um foco inflamatório único no local da lesão, não prosseguimos com a investigação.

Descrevemos, com sucesso, a dinâmica de recrutamento de neutrófilos e macrófagos num modelo de transecção da espinal medula em peixe zebra. A definição desta dinâmica permitir-nos-á desenhar novas experiências usando uma abordagem inflamatória genética.

Key-words: acute renal injury; cardiac surgery; tubular biomarkers

Spinal cord injury (SCI) affects 58 per million new people per year in Portugal. As it impairs motor and sensory functions permanently, it impacts on the patient's physical, psychological and social well-being.

In mammals, SCI leads to scarring to maintain tissue integrity. However, in zebrafish the spinal cord regenerates structurally and functionally the lost tissue, without a scar.

After a lesion, the blood-spinal cord barrier is lost and the immune system is activated leading to an accumulation of leucocytes as well as activated microglia. Therefore, inflammation is a player in modulating the microenvironment at the lesion site.

Zebrafish inflammation never becomes chronic and moreover, it was demonstrated that an initial and transient inflammation seems to be beneficial in a brain injury model. However, if the same is true for the spinal cord is not known yet. In the mouse, the situation is different with chronic inflammation persisting for extended periods and leading to excess scarring and cell death.

We hypothesized that extending the inflammation period in a zebrafish spinal cord injury model will negatively impact on regeneration. Our objective was to induce a chronic inflammation and evaluate its regenerative outcome.

Zebrafish larvae spinal cord transection was done at 5 days-post-fertilization, at the anal pore level. The inflammatory response dynamics was studied by following neutrophils recruitment to the injury site, using transgenic fish Tg (mpx:EGFP). We found a peak of neutrophils recruitment between 5-7 hours-post-lesion (hpl) that was resolved at 96 hpl.

We also analyzed larvae from a macrophage's transgenic line Tg (mpeg:EGFP) - a gift from Champalimaud Fish Facility. We found that macrophage recruitment to the lesion site was very variable between larvae, but nonetheless we could describe the persistence of these phagocytic cells between 24-48 hpl.

To induce a sterile inflammation, we applied Zymosan A (Sigma) in water and in intramuscular injections. As we were unable to dissolve this drug in water, we resort to the injection delivery mode. The relation between the injection of the pro-inflammatory drug and the extent of the inflammatory response was very variable between larvae. Although there was a lot of variability upon Zymosan A injection the bottom line is that we were able to induce inflammation. Therefore, we continued the experiments by combining transection with drug application at the same time. We analyzed the larvae 22 hours after and observed two different focus of inflammation, one at the site of the lesion and another one at the site of the injection. Since we could not induce a single inflammatory focus at the lesion site, no further experiments were done.

We successfully described the dynamics of neutrophils and macrophages recruitment in a spinal cord transection model in zebrafish larvae. The definition of this dynamics will allow us to design future experiments using a genetic inflammatory approach.

Alunos | **Students:** Alexandre Manuel Freixial Vasques

Tutores | **Tutors:** Ana Isabel Lopes

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Clínica Universitária de Pediatria / Pediatric University Clinic

E-mail: alexandrevasques@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/19

Título: Das Células Dendríticas aos Linfócitos: Novos Protagonistas na Esofagite Eosinofílica?

Title: From Dendritic Cells to Lymphocytes: Emerging Players in Eosinophilic Esophagitis?

Palavras-Chave: Esofagite Eosinofílica na Criança; Resposta Imune; Imunohistoquímica

Introdução: A Esofagite Eosinofílica (EoE) é uma entidade clinico-patológica emergente, de reconhecimento crescente em adultos e crianças, consequência de uma inflamação crónica antigénio(alergénio)-mediada da mucosa esofágica, caracterizada por intenso infiltrado eosinofílico. A lesão epitelial inflamação crónica e subsequente remodelling associado têm importantes implicações clínicas. Embora o perfil celular/citocinas da mucosa esofágica pareça distinto (com polarização Th2 predominante), o papel de fenótipos celulares específicos na sua indução permanece por elucidar. É relevante a identificação de novos alvos terapêuticos (terapêuticas atuais não específicas) e subjacente caracterização detalhada da resposta imunoinflamatória, particularmente em estadios precoces.

Objetivos: considerando a EoE em idade pediátrica como modelo de estudo (estadio mais precoce, envolvimento frequente de alergénios), foi caraterizado o perfil celular in situ recorrendo a técnicas de imunohistoquímica (IHQ). Tanto "células clássicas" (eosinófilos e mastócitos), como outros tipos celulares ainda pouco estudados (linfócitos, células dendríticas e basófilos), foram avaliados.

Metodologia: estudo observacional; biópsias esofágicas de arquivo referentes a crianças/jovens com menos de 17 anos, previamente submetidos a endoscopia, com o diagnóstico de EoE (GE, n=11) ou sem alterações (GC, n=10). Foram excluídas co-morbilidades e obtidos dados clínicos, endoscópicos e histológicos. A densidade e localização das células na mucosa esofágica foram avaliadas, bem como a sua associação com dados clínicos e endoscópicos. Histologia convencional: cortes de 3µm de biopsias fixadas em 10% de formol, embebidas em parafina, coradas com HE; IHQ: cortes de 3µm de biopsias embebidas em parafina, foram desparafinizados e corados com anticorpos primários usando método indireto (DAB): anti-triptase (mastócitos), anti-CD3, CD4, CD-8 (células T), CD20 (células B); anti-CD1a (CDs) e anti BB1a (basófilos); a contagem e distribuição celular foram avaliados na mucosa em 5 CGA (ampliação 40x);resultados expressos como numero de células/mm2. A avaliação histológica foi realizada por patologista experiente (AP) e a leitura de IHQ por um observador (AV), após validação da variação intra e inter-observador.

Resultados: Nos indivíduos com EoE identificou-se mais frequentemente doença atópica, alterações características endoscópicas e histológicas. IHQ: observou-se um número de células/mm2 significativamente superior no GE vs GC, relativamente a Mastócitos, Linfocitos T/CD4 e Basófilos ($p \leq 0,05$), mas não aos linfócitos B, CD8 e CDs. A densidade dos mastócitos e basófilos relacionou-se com os sintomas e achados endoscópicos, respetivamente ($p = 0,038$ e $p = 0,041$).

Conclusão: Estes resultados preliminares, em associação ao conhecimento atual, dão ênfase aos mastócitos como marcador relevante na EoE pediátrica e a outras células ainda escassamente estudadas neste contexto, como os linfócitos T e basófilos. Pelo contrário, os linfócitos B e as células dendríticas, não parecem ter um papel determinante neste estadio. Estudos adicionais em diferentes contextos da EoE, permitirão elucidar a interação e funcionalidade de diversos tipos celulares.

Key-words: Childhood Eosinophilic Esophagitis; Immune Response; Immunohistochemistry

Background: The emerging entity eosinophilic esophagitis (EoE) is a clinicopathological progressive condition of increasing recognition adults/children, consequence of a chronic antigen(allergen)-mediated inflammation of esophageal mucosa, with a dense eosinophilic infiltrate. Chronic inflammation and subsequent remodeling have important clinical implications. Though the EoE mucosal cell/chemokine profile seems distinctive (Th2-type predominant polarization), the role of specific mucosal cells in promoting inflammation is yet to be elucidated. Specific pathways that could be targeted to treat EoE (currently nonspecific treatments) need to be identified; thus preliminary detailed characterization of the inflammatory infiltrate is a challenge, particularly at early stages.

Objectives: Using childhood EoE as a study model (earlier disease stage,frequent involvement of allergic triggers), the in situ immunophenotypic cell profile in esophageal mucosa was assessed, using Immunohistochemistry (IHC). Both "classical cells" (eosinophils, mastocytes), as well as other cell types, yet scarcely evaluated, such as T and B cells, dendritic cells (DCs) and basophils, were addressed.

Methods: observational study, concerning representative archived esophageal biopsies from patients aged under 17 yr, previously submited to endoscopy due to upper GI symptoms with EoE diagnosis (SG, n=11) or with no abnormalities (CG, n=10). Co-morbidities were excluded; demographic, clinical, endoscopic/histological data were collected. The density and location in esophageal mucosa of Eosinophils, Mast cells, Basophils, T / B Lymphocytes and Dendritic Cells, were assessed, as well as their association with clinical/endoscopic features. Conventional histology: 3µm slice biopsies sections fixed in 10% formalin, parafin-embedded were stained with HE; IHC: 3µm slices from paraffin embedded biopsy sections were deparaffinized, boiled and immunostained with primary antibodies using the indirect method for detection – DAB (anti-triptase,CD3, CD4,CD-8, anti-CD20, anti-CD1a, anti-BB1a); cell count, distribution and topography, were assessed in 5 non-overlapping HPF (40x magnification). Results were expressed as number of cells/mm2. Histopathological evaluation was performed by an experient pathologist; cell counts were made by one blinded observer after intra-observer variance validation.

Results: EoE individuals had more frequently atopic disease, characteristic endoscopic/histological findings. Significantly higher cell nº/mm2 were observed in SG as compared to CG, concerning CD3, CD4, Mastocytes and Basophils ($p \leq 0.05$) but not concerning CD20, CD8 and DCs ($p > 0,05$). Mast cells and basophils were the only cell types associated with symptoms and endoscopy findings, respectively ($p = 0,038$, $p = 0,041$).

Conclusion: these preliminary findings allied with current knowledge, emphasize mast cells infiltrate as a relevant marker in pediatric EoE and the potential emergent role of previously unrecognized cell players, such as T cells and basophils. At this stage of active pediatric disease, B cells and Dendritic cells, do not seem to be central players. Further studies are warranted, concerning elucidation of networking/functionality of specific cell subsets at different disease stages, including of the TSLP-Basophil axis role.

Alunos | **Students:** Ana Catarina Fonseca Relvas

Tutores | **Tutors:** Hélia Cristina de Oliveira Neves

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

E-mail: anacatarinarelvas@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/24

Título: Efeitos funcionais da forma extracelular da HSP90 na activação dos macrófagos no contexto de neoplasia do ovário

Title: The functional effects of the extracellular form of the Heat-Shock Protein 90 on macrophage activation in ovarian cancer cells

Palavras-Chave: HSP90; macrófagos; vigilância imunitária tumoral

As proteínas de choque térmico (heat-shock proteins – HSPs) desempenham importantes funções nos processos de crescimento tumoral, metastização e evasão à apoptose. A HSP90 em particular tem-se destacado como promissor alvo terapêutico devido à sua capacidade de, intracelularmente, estabilizar proteínas oncogénicas e, extracelularmente, contribuir para a invasão tumoral.

No nosso laboratório dedicamo-nos, atualmente, ao estudo dos efeitos de um novo reagente bloqueador da atividade da forma extracellular (e) da HSP90, o anticorpo anti-eHSP90. Previamente, demonstrámos a sua capacidade de bloquear a migração celular em linhas tumorais humanas eHSP90+. Considerando o envolvimento de outras HSPs na complexa sinalização que regula macrófagos associados ao tumor (tumour-associated macrophages – TAMs) pró- (M1) ou anti-inflamatórios (M2), decidimos explorar os adicionais papéis imunomodeladores da eHSP90, que possam ser benéficos (ou prejudiciais) no contexto do tratamento do cancro.

Neste projeto procuramos avaliar os possíveis efeitos da eHSP90 na imunomodulação de TAMs M1 e M2 no microambiente do cancro do ovário (as neoplasias do ovário têm elevados rácios M2/M1, relacionados com a progressão tumoral e com piores taxas de sobrevivência) através de um ensaio de co-cultura de macrófagos humanos com OVCAR8, uma linha celular humana eHSP90+.

Sumariamente, monócitos do sangue periférico foram diferenciados em macrófagos (M0) com GM-CSF durante 7 dias em cultura. Nas 48h seguintes, os macrófagos foram polarizados nos fenótipos M1 ou M2 usando LPS + INF-γ e IL4 + IL13, respetivamente. Para testar os efeitos do anti-eHSP90 no microambiente de cancro do ovário, OVCAR8 e anticorpo foram adicionados no momento da polarização in vitro de macrófagos. A análise fenotípica foi realizada por citometria de fluxo usando marcadores de superfície celular, CD14, CD91 (recetor HSP), CD64 e CD1a, e um kit de citocinas inflamatórias para medir a produção de IL8, IL1b, IL6, IL10, TNF e IL12p70.

Durante a diferenciação in vitro, observámos uma redução da expressão de CD14 e CD64 (CD14lowCD64low), acompanhada de um ligeiro aumento dos níveis de CD91 (condição de controlo). Após mais 48h em meio M1, foi observado um acréscimo signficativo na produção de IL8, IL6 and TNF na população CD14lowCD64low, quando comparada com a M0.

Para testar as funções imunomoduladoras da eHSP90 no microambiente tumoral, macrófagos M0 foram colocados em co-cultura com anti-HSP90 e células OVCAR8, num meio M1. Embora não tenhamos observado alterações nos marcadores de superfície celular, verificou-se um aumento significativo de 3 vezes na produção de IL8, quando comparado com o grupo controlo. Neste momento estamos a estudar os efeitos do anticorpo anti-eHSP90 nas condições M2.

Os dados obtidos apoiam a existência de um papel imunomodulador da HSP90 que não deverá ser esquecido ao usar o anticorpo anti-eHSP90 em contexto clínico, considerando a ação pleiotrópica da IL8 na progressão do cancro do ovário.

Key-words: HSP90; macrophage; cancer immune surveillance

Heat-shock proteins (HSPs) play important roles in tumour cell growth, metastasis and apoptosis evasion. Particularly HSP90 has gained interest as a promising anticancer drug target, due to its intracellular roles to stabilize “client” key oncogenic proteins and extracellular actions in tumour cell invasiveness.

In our laboratory we are currently studying the effects of a new blocking reagent for the activity of the extra-cellular (e) form of HSP90, an antibody against eHSP90. We have previously showed its capacity to block cell migration of human eHSP90+ cancer cell lines. Considering the involvement of other HSP family members in complex checkpoints signals that regulate pro- (M1) and anti-inflammatory (M2) tumour-associated macrophages, we decided to explore additional immunomodulatory roles of eHSP90 that may be beneficial (or harmful) in the context of cancer treatment.

In this project we aim to evaluate the possible effects of eHSP90 in the immunomodulation of M1 and M2 tumour-associated macrophages in ovarian tumour microenvironment context (ovarian tumours have high M2/ M1 ratio, correlated with cancer progression and poor patient survival). For that, we developed a co-culture assay of human macrophages with OVCAR8, a human eHSP90+ ovarian cell line.

Briefly, peripheral blood monocytes were differentiated into macrophages (M0) with GM-CSF for 7 days in culture. In the following 48h, macrophages were further polarized either into M1 or M2 phenotypes using LPS+INF-γ and IL4+IL13, respectively. To test the effects of anti-eHSP90 in an ovarian cancer microenvironment, anti-eHSP90 and OVCAR8 cells were added to the in vitro step of macrophage polarization. Phenotypic analysis was performed by flow cytometry using the cell surface markers, CD14, CD91 (HSP receptor), CD64 and CD1a, and an inflammatory cytokines kit to measure the production of IL8, IL1b, IL6, IL10, TNF, and IL12p70.

During in vitro M0 differentiation, we observed a reduction in the expression levels of CD14 and CD64 (CD14lowCD64low), accompanied by a slight increase in CD91expression (control condition). After further 48h in M1-medium, a significant augmentation in the production of IL8, IL6 and TNF was observed in the CD14lowCD64low population, when compared to M0.

To test the immunomodulatory functions of eHSP90 in a tumour microenvironment, M0 macrophages were then co-cultured with anti-eHSP90 and OVCAR8 cells in M1-medium. While no changes were observed in cell surface markers, a significant 3-fold increase of IL8 production was detected when compared to the control. We are currently studying the anti-eHSP90 effects in M2-conditions.

Together our data supports the existence of an immunomodulatory role of eHSP90 that should be taken into account when using anti-eHSP90 in clinical setting, considering IL8 pleotropic roles in ovarian cancer progression.

Alunos | **Students:** Mickael Varoujan Bartikian; Angélica Maria Machado Ferreira

Tutores | **Tutors:** Lia Pereira Lucas Neto

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Instituto de Anatomia, FMUL / Anatomy Institute, FMUL

E-mail: mickaelbartikian@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/26

Título | Title: Criação De Modelos Vasculares Por Impressão Tridimensional (3D) / 3D Printing Vascular Models

Palavras-Chave: Impressão 3D, Anatomia, Vascular

Introdução e Objectivos: O ensino da Anatomia constitui uma parte fundamental do ensino médico, especialmente para imagiologistas. O sistema vascular é apresentado principalmente através de textos e imagens onde a tridimensionalidade das dissecções cadavéricas e dos modelos de plástico fica ausente. Deste modo, a redução do treino médico baseado em dissecções requer uma abordagem moderna da Anatomia. O Instituto de Anatomia da FMUL tem desenvolvido vários projectos nesse sentido com a criação de modelos plastinizados do encéfalo e de modelos de ossos da cabeça por impressão 3D. Em continuidade com o último, temos usado uma impressora 3D com o objectivo de produzir modelos vasculares do sistema carotídeo e vertebrobasilar para serem usados nas aulas de Anatomia e disponibilizados aos alunos. O nosso objectivo secundário foi imprimir modelos 3D destes sistemas com patologia, como casos de aneurisma cerebral, para fornecer a neurorradiologistas de intervenção e à indústria novas formas de treino e de concepção de dispositivos para procedimentos endovasculares.

Material e Métodos: Foram seleccionados exames de angio-TC do sistema arterial carotídeo e vertebrobasilar de indivíduos saudáveis e de doentes com malformações vasculares intracranianas. As imagens foram processadas com software de segmentação para recontruir as artérias. Os volumes digitais finalizados foram convertidos para ficheiros em formato compatível com a impressora 3D. Foram usadas duas impressoras 3D de tecnologia de modelagem por depósito de materal fundido, Prusa i3 e Zortrax M200, com filamentos de poli-ácido láctico (PLA) e de acrilonitrilo butadieno estireno (ABS).

Resultados: Foram impressos com sucesso modelos do sistema arterial cerebral com bom detalhe e qualidade. Foi também impresso um modelo arterial de um caso de ruptura de aneurisma da artéria cerebral média com resultados satisfatórios.

Conclusão: As ferramentas de pós-processamento de imagem e a tecnologia de impressão 3D provaram-se novamente como uma mais-valia da Medicina moderna. É possível criar modelos vasculares fidedignos, práticos e rentáveis para as aulas de Anatomia e para alunos. A neurorradiologia de intervenção e a indústria podem usar modelos de impressão 3D para obter uma melhor visualização da anatomia, para testar novos dispositivos ou para treinar procedimentos específicos a partir de casos reais.

Key-words: 3D printing, Anatomy, Vascular

Introduction and Objectives: The teaching of anatomy is a fundamental part of medical education, especially for radiologists. The vascular system is mainly presented through text and images, lacking the tri-dimensionality of cadaver dissections or full-size resin models. Therefore, the reduction in dissection-based teaching in medical training demands a modern approach to anatomy. Previously, the Anatomy Institute (Lisbon Medical Faculty) has harboured several projects to create plastinated models of the brain and 3D-printed head bone models. In continuity with the latter, we have been using a 3D printer to produce vascular models of the carotid and vertebrobasilar systems, so that they can be used in anatomy classes and made available to students. Furthermore, our goal was to print 3D models of these systems with abnormalities, such as cerebral aneurysms, to provide interventional radiologists and industry new ways to train and prepare devices for endovascular procedures.

Material and Methods: We selected Angio-CT scans of the carotid and vertebrobasilar arterial systems from healthy subjects and from patients with vascular malformations. The images were processed with segmentation software to reconstruct the arteries. The final digital volumes were converted into a printable file format for the 3D printer. We used fused deposition modelling technology 3D printers (the Prusa i3 and the Zortrax M200) with polylactic acid (PLA) and acrylonitrile butadiene styrene (ABS) filaments.

Results: Normal cerebral arterial vasculature models were successfully 3D printed with fine detail and good quality. We also printed a case of a ruptured middle cerebral artery aneurysm and we obtained satisfying results.

Conclusion: The image post-processing tools and the 3D printing technology have once again proved as valuable assets of modern Medicine. We can create reliable, practical, and cost-effective vascular models for anatomy classes and students. Interventional radiologists and industry can use the 3D printed models to obtain a better visualization of the anatomy, to test new devices or to practice a specific treatment procedure.

SESSÕES POSTERS IV

Moderadores: Luísa Lopes | Sofia Reimão

20º PROGRAMA
EDUCAÇÃO PELA CIÊNCIA
Projetos de Investigação Laboratorial ou Clínica

BOLSAS CHLN/FMUL
Projetos de Investigação Clínica

Alunos | **Students:** David Alexandre de Azoia Ferreira Prescott

Tutores | **Tutors: João Nuno Guerra da Costa**

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Laboratório Farmacologia Clínica e Terapêutica | Laboratory of Clinical Pharmacology and Therapeutics

E-mail: davidaaf@gmail.com

Projeto | **Project**

2017 PEC/04

Título: Estimulação Cerebral Profunda na Distonia

Title: Deep Brain Stimulation in Dystonia

Palavras-Chave: Distonia; Estimulação Cerebral Profunda; Revisão Sistemática

Fundamento: A distonia é um distúrbio doloroso e incapacitante caracterizado por uma postura involuntária dolorosa das regiões afetadas. A estimulação cerebral profunda (ECP) é uma intervenção tipicamente reservada para casos refratários ou graves, embora existam incertezas quanto à sua eficácia, segurança e tolerabilidade.

Objetivos: Comparar a eficácia, segurança e tolerabilidade da ECP versus estimulação simulada, melhor terapia médica ou placebo em pessoas com distonia.

Métodos: Identificaram-se estudos para inclusão na revisão usando o Cochrane Movement Disorders Group Trials Register, the Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL), MEDLINE, Embase, listas de referência de artigos incluídos, procedimentos de conferência, literatura cinzenta e registros de ensaios clínicos até Julho de 2017. Foram incluídos ensaios clínicos duplo-cegos, paralelos, randomizados e controlados (RCTs) comparando ECP versus estimulação simulada, melhor terapia médica ou placebo em adultos com distonia. Realizaram-se meta-análises usando um modelo de efeitos aleatórios. O resultado de eficácia primário foi a melhoria em qualquer escala sintomática validada e o resultado de segurança primária foi eventos adversos.

Resultados: Incluímos dois RCTs, incluindo um total de 102 participantes. Ambos os ensaios avaliaram o efeito do DBS no núcleo de GPi, com avaliação de resultados aos 3 e 6 meses de estimulação. Um dos estudos incluiu participantes com distonia generalizada e segmentar, enquanto o outro incluiu participantes com distonia cervical. Ambos os estudos foram considerados de alto risco para vários domínios.

A ECP pode melhorar o comprometimento relacionado com a distonia cervical, com uma diferença média de 9.8 unidades (IC 95% 16.08 menos para 3.52 unidades menos) mais baixas na Toronto Western Spasmodic Torticollis Rating Scale (TWSTRS) aos 3 meses. Não temos certeza de que a ECP melhore o comprometimento geral relacionado com a distonia generalizada ou segmentar. A ECP pode ter pouca ou nenhuma diferença no risco de eventos adversos e na tolerabilidade (RR 1.58, IC 95% 0.98 a 2.54).

Conclusões: Evidência de baixa qualidade mostra que a ECP pode melhorar a eficácia geral no tratamento da distonia cervical em adultos com distonia moderada a severa. Devido a uma qualidade de evidência muito baixa, não é claro se a ECP melhora a eficácia geral na distonia generalizada e segmentar. O tratamento com ECP parece seguro e tolerável. São necessários estudos adicionais para estabelecer eficácia clínica, segurança e tolerabilidade.

key-words: Dystonia; Deep Brain Stimulation; Systematic Review

Background: Dystonia is a painful and disabling disorder characterised by painful involuntary posturing of the affected region(s). Deep brain stimulation (DBS) is an intervention typically reserved for refractory or severe cases, although uncertainty exists regarding its efficacy, safety and tolerability.

Objectives: To compare the efficacy, safety, and tolerability of DBS versus sham-stimulation, best medical therapy or placebo in people with dystonia.

Methods: We identified studies for inclusion in the review using the Cochrane Movement Disorders Group Trials Register, the Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL), MEDLINE, Embase, reference lists of included articles, conference proceedings, grey literature, and clinical trial registries up to July 2017. Double-blind, parallel, randomised, controlled trials (RCTs) comparing DBS versus sham-stimulation, best medical care or placebo in adults with dystonia were included. We performed meta-analyses using a random-effects model. The primary efficacy outcome was improvement on any validated symptomatic rating scale, and the primary safety outcome was adverse events.

Main results: We included two RCTs, enrolling a total of 102 participants. Both trials evaluated the effect of DBS on the GPi nucleus, with outcome assessment at 3 and 6 months of stimulation. One of the studies included participants with generalised and segmental dystonia, while the other included participants with cervical dystonia. Both studies were considered at high risk for several domains.

DBS may improve cervical dystonia related impairment, with a mean difference of 9.8 fewer units (95% CI 16.08 fewer to 3.52 fewer units) on the Toronto Western Spasmodic Torticollis Rating Scale (TWSTRS) at 3 months. We are uncertain whether DBS improves overall generalised or segmental dystonia related impairment. DBS may have little or no difference in the risk of adverse events and tolerability (RR 1.58, 95% CI 0.98 to 2.54).

Conclusions: Low quality evidence shows that DBS may improve overall efficacy in the treatment of cervical dystonia in adults with moderate to severe dystonia. Due to very low quality of evidence, it is unclear whether DBS may improve overall efficacy in generalised and segmental dystonia. Treatment with DBS may appear to be safe and tolerable. Further research is still needed to establish clinical efficacy, safety and tolerability.

Alunos | **Students:** Duarte Nuno Pereira Vinha, João Francisco Ferreira Simões, Sara França Moreira
Tutores | **Tutors: Rodrigo Roquette Gonçalves, António José Gonçalves Ferreira**
Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Anatomia /** Anatomy Institute
E-mail: duartevinha@campus.ul.pt; jffsimoes@campus.ul.pt; sfmoreira@campus.ul.pt

Projeto | **Project**
2017 PEC/08

Título: MAPEAMENTO DOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS NO TUBO DIGESTIVO. Estudo comparativo do feto e do adulto.

Title: DIGESTIVE TRACT DOPAMINERGIC RECEPTORS MAPPING. Comparative study of the fetus and adult.

Palavras-Chave: Dopamina; Tracto gastrointestinal; Feto

Fundamento: A dismotilidade gastrointestinal é uma patologia bastante prevalente na população pediátrica. Em muitos casos, manifesta-se por vómitos e/ou diarreia, tendo como consequência intolerância alimentar, o que pode implicar nutrição parentérica total. Para controlo médico desta situação são usados medicamentos pró-cinéticos, entre os quais se destacam os antagonistas dopaminérgicos. Porém, os resultados destas terapêuticas nem sempre são os esperados, ocorrendo em alguns casos efeitos não desejados ou paradoxais. A distribuição dos recetores D1 e D2 no trato gastrointestinal (TGI) na população pediátrica não está descrita, sendo os efeitos clínicos destes fármacos inferidos a partir de estudos em adultos.

Objetivos:
- Mapear a distribuição dos recetores dopaminérgicos D1 e D2 no TGI;
- Criar um mapa funcional dos diversos segmentos anatómicos do TGI;
- Inferir acerca dos efeitos clínicos dos antagonistas dopaminérgicos.

Métodos: Obtenção de amostras de TGI completo em dois cadáveres adultos e dois cadáveres fetais. Processamento das amostras para estudo em histopatologia (H&E) e posterior marcação por imunohistoquímica (IHQ) para os recetores de dopamina D1 e D2. Análise dos resultados histológicos por patologista. Construção de mapa de distribuição da marcação para receptores dopaminérgicos ao longo do TGI.

Resultados: Após as preparações do estudo IHQ estarem coradas, observamos dois resultados distintos:
- O epitélio gastrointestinal dos cadáveres adultos sofreu autólise, não sendo possível observar qualquer marcação. Para comparação da marcação dopaminérgica em adulto, utilizou-se a base de dados Human Protein Atlas;
- O epitélio gastrointestinal dos cadáveres fetais manteve-se íntegro, com coloração H&E adequada bem como a marcação IHQ (tanto para os recetores D1 como para os recetores D2); O estudo IHQ dos TGI dos fetos evidenciou, na região pilórica, uma grande densidade da marcação dos recetores D1 e uma densidade intermédia dos recetores D2. Foi ainda verificada densidade intermédia de marcação D2 ao longo do jejuno-íleon, sem predomínio de segmentos. No restante trato gastrointestinal, a marcação foi inespecífica.

Conclusões: A distribuição similar dos recetores D1 e D2 em ambos os fetos sugere a existência de uma disposição sistemática dos mesmos. Comparativamente ao adulto, onde a marcação D1 é a mais intensa e dispersa ao longo do TGI, o feto apresenta imaturidade para tal marcação, apenas marcando no piloro. No que respeita a marcação D2, a marcação fetal assemelha-se à marcação do adulto, excepto a marcação inespecífica do cólon. Tal resultado pode permitir utilizar com maior segurança os antagonistas D2. No que respeita ao efeito dos pró-cinéticos no esvaziamente gástrico, provavelmente o efeito deve-se à acção dos mesmos no piloro, sendo necessários estudos funcionais.

A autólise observada nos cadáveres adultos deve-se provavelmente ao intervalo de tempo entre a morte e a preparação, imposto por questões legais, apresentando-se como principal limitação do presente estudo.

key-words: Dopamine; Gastrointestinal tract; Fetus

Background: Gastrointestinal dismotility is a frequent disorder in pediatric population. In many cases, it may be manifested as vomiting or diarrhea with oral intolerance, which implies total parenteral nutrition. Pro-kinetic agents, in which dopaminergic antagonists are included, are used for medical control of this disorder. However, the results are not always the predictable, with some paradoxal effects. D1 and D2 receptors distribution in the gastrointestinal tract (GIT) in the pediatric population is not described, with pharmacologic effects based on adult studies.

Objectives:
- Mapping D1 and D2 receptors in the GIT;
- Functional mapping of the anatomic segments of the GIT;
- Theoretical prediction of dopaminergic antagonists clinical effects.

Methods: Complete GIT sampling of two adult and two fetal cadavers. Sample processing for histopathologic (H&E) and imunohistochimic (IHQ) coloration of D1 and D2 dopamine receptors. Histologic evaluation by and experienced pathologist. GIT mapping of the dopaminergic receptors.

Results: After IHQ processing of samples, two results were obtained:
- Adult cadaveric GIT epithelium suffered autolysis, which limited IHQ coloration. For adult mapping Human Protein Atlas database was used;
- Fetal cadaveric GIT epithelium was maintained, enabling H&E and IHQ coloration (for D1 and D2 dopamine receptors). IHQ coloration in the fetus revealed, in the pylorous, a high density of D1 receptors and medium density of D2 receptors. In the jejunum-ileon medium density was observed for D2 receptors, with equal distribution along this segment. The remaining GIT had inespecific result.

Conclusions: Similar distribution of D1 and D2 receptors in both fetal cadaver suggests a systematic disposition of this receptors. When comparing to the adult GIT, where D1 density is higher and more evident along the tract, fetus presents with immaturity for this coloration, only being expressed in the pylorous. Considering D2 density along the GIT, fetal distribution is similar to the adult, except for inespecific coloration of the colon. This result may be a step to allow improved security when using D2 receptors antagonists. The gastric empting effect of pro-kinetic agents is probably due to its actions on the pylorous, with need of functional studies for confirmation.

The autolysis of adult cadavers is probably due to the amount of time between the death and the sample preparation, which is imposed by legal aspects, being the main limitation of this study.

Alunos | **Students:** Ana Carolina Aranda Marta Almeida; Margarida Isabel Farinha Pascoal; Miguel de Oliveira Carvalho

Tutores | **Tutors:** João Luís Cavaco; Ivo Álvares Furtado

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Instituto de Anatomia, FMUL / Anatomy Institute, FMUL

E-mail: anacarolinaa@campus.ul.pt; margaridapascoal@campus.ul.pt; miguel-carvalho@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/20

Título: Estudo da Vascularização do Sistema Nervoso Autónomo Simpático Cervical no Cadáver Humano.

Title: Blood Supply of the Human Cervical Sympathetic Autonomic System

Palavras-Chave: Sistema simpático cervical; Síndrome de Horner; Diafanização

Fundamento: O conhecimento detalhado da anatomia vascular cervical é essencial, cirúrgica e imagiologicamente. A abordagem a certas patologias tumorais da região, nomeadamente paragangliomas, tem envolvido cada vez mais uma primeira intervenção neurorradiológica (embolização), que origina uma isquémia iatrogénica do tumor, reduzindo a sua dimensão, permitindo uma mais fácil extração cirúrgica. Tem-se observado nestes casos, com maior frequência, uma isquémia pós-embolização da região peri-tumoral, atribuída à complexidade da anatomia arterial cervical.

A região cervical apresenta várias estruturas nervosas, correspondendo aos últimos quatro nervos cranianos (glossofaríngeo; vago; acessório; hipoglosso), plexo cervical e porção supra-clavicular do plexo braquial. Uma isquémia iatrogénica pós-embolização poderá originar diversos quadros neuropáticos, de gravidade variável, dependendo das estruturas lesadas. Existem casos descritos de síndrome de Horner, caracterizada por miose, ptose e anidrose, resultante da lesão do tronco simpático cervical, cuja vascularização tem sido escassamente reportada na literatura.

A plastinização é uma técnica de preservação de peças anatómicas que tem vindo a ser desenvolvida e implementada no Instituto de Anatomia da FMUL, permitindo criar modelos resistentes de peças impregnadas com polímero, que podem ser facilmente manipulados, sendo frequentemente utilizados e bem recebidos pelos alunos nas áreas de Anatomia e Neuroanatomia.

A diafanização corresponde a uma técnica de conservação anatómica que permite a preservação de tecidos vasculares, revelando a distribuição das artérias principais e suas ramificações capilares, permitindo observar a distribuição capilar ao longo dos nervos periféricos em estudo.

Objetivos: Descrever a vascularização da porção cervical do sistema nervoso simpático, identificando a anatomia mais frequente, assim como variações existentes; Realizar a plastinização e diafanização das peças anatómicas a serem estudadas, com posterior aplicação como material de estudo nas aulas práticas de Anatomia e Neuroanatomia.

Métodos: Foram dissecadas as regiões cervicais de três cadáveres humanos, com identificação das principais estruturas arteriais circundantes do tronco simpático cervical, posteriormente submetidas a plastinização e diafanização.

Resultados: Desenvolveram-se modelos anatómicos da região cervical. Identificaram-se os principais vasos que participam na irrigação do tronco simpático, com destaque para ramos tributários da carótida externa superiormente, como a artéria faríngea ascendente, e ramificações da artéria subclávia inferiormente.

Conclusões: É possível obter modelos anatómicos a partir de tecidos humanos preservados, que permitem o estudo da região cervical e sistema simpático cervical, sendo aplicáveis ao ensino da Anatomia e contribuindo para um aumento da casuística do estudo da vascularização. Este projeto corresponde a um "primeiro passo" no mapeamento arterial da neuroanatomia cervical, a ser continuado em anos futuros.

Key-words: Cervical Sympathetic System; Horner's Syndrome; Diaphanization

Background: A full appreciation of the neck's vascular anatomy is surgically and radiologically necessary. Certain cervical tumors, such as paragangliomas, have been first approached by endovascular interventions (embolization), which result in improved tumor surgical resection directly related to decreased tumor blood supply. There have been reports of postembolization peritumoral ischemia, which can affect neighboring structures.

The human cervical region contains the lower four cranial nerves (glossopharyngeal; vagus; accessory spinal; hypoglossal), cervical plexus and supraclavicular brachial plexus. Therefore, an iatrogenic postembolization ischemia can result in several possible neurological dysfunctions. There are reports of postembolization Horner's syndrome, characterized by ipsilateral miosis, ptosis and anhidrosis, due to the human cervical sympathetic chain's lesion, whose blood supply has been scarcely studied.

Plastination is a well-established technique that has been developed and implemented in the Anatomy Department of LMS, that allows the creation of clean, resistant and accurate anatomical models, which have been frequently used and well-received by students in the study of Anatomy and Neuroanatomy.

At last, diaphanization is a well-known method that allows the study of the arterial distribution of preserved specimens, complementing our investigation of the blood supply of peripheral nerves.

Objectives: To describe the blood supply of the human cervical sympathetic chain, identifying the most frequent anatomy and possible variations; To apply both plastination and diaphanization techniques, creating anatomical models to be used in the study of Anatomy and Neuroanatomy;

Methods: We dissected both cervical regions of three human cadavers, identifying the major arterial vessels surrounding the human sympathetic chain. We then applied plastination and diaphanization techniques.

Results: We created anatomical models of the human cervical region. We identified the most significant vascular branches that supply the cervical sympathetic chain, determining that the primary arterial supply of the upper cervical chain is via external carotid artery tributaries, such as the ascending pharyngeal artery, while the lower cervical chain is supplied by subclavian artery branches.

Conclusions: It is possible to create anatomical models of preserved biologic specimens, allowing the study of the human cervical region and sympathetic chain, as well as casuistically increasing our knowledge of its arterial supply. These models can be applied to the teaching of Anatomy. Our study is a "first step" towards fully mapping the arterial supply of the cervical region's peripheral nerves, to be continued in future years.

Alunos | **Students:** Aldara Faria; Maria Eduarda Neves
Tutores | **Tutors:** João Luís Cavaco; Ivo Álvares Furtado
Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Instituto de Anatomia, FMUL / Anatomy Institute, FMUL
E-mail: aldarafaria@campus.ul.pt; mariaeduarda@campus.ul.pt

Projeto | **Project**
2017 PEC/22

Título: Estudo da Vascularização dos Nervos Mediano e Cubital no Cadáver Humano – Importância na utilização de retalhos livres de nervos periféricos.

Title: Blood Supply of the Human Median and Ulnar Nerves – Importance in free vascularized nerve grafting

Palavras-Chave: Plexo Braquial; Retalho livre de Nervo Periférico; Diafanização

Fundamento: A reparação de defeitos neuronais periféricos tem vindo a ser melhorada através de várias técnicas microcirúrgicas. A utilização de retalhos livres vascularizados de nervos periféricos (auto-enxerto de nervo periférico, com parte do seu pedículo vascular) é reservada para contextos específicos, nomeadamente quando o território de transplante apresenta um elevado grau de isquémia ou fibrose; quando a distância entre os dois nervos a serem unidos (nerve gap) é particularmente grande; ou quando o nervo a ser utilizado como retalho apresenta um diâmetro considerável, dificultando a manutenção da sua vascularização no local de transplante.

O conhecimento atual da vascularização dos nervos periféricos encontra-se incompleto. É necessária a sua descrição detalhada para melhoria da eficácia da técnica cirúrgica, assim como para identificação de nervos periféricos úteis como retalhos. O plexo braquial corresponde a um possível alvo de estudo, dado o elevado número de ramos colaterais que origina. Dada a sua complexidade, a literatura relativa à sua vascularização detalhada é escassa.

A plastinização é uma técnica de preservação de peças anatómicas que tem vindo a ser desenvolvida e implementada no Instituto de Anatomia da FMUL, permitindo criar modelos resistentes de peças anatómicas impregnadas com polímero, que podem ser facilmente manipulados, sendo frequentemente utilizados pelos alunos nas áreas de Anatomia e Neuroanatomia.

A diafanização corresponde a uma técnica de conservação anatómica que permite a preservação de tecidos vasculares de tecidos vasculares, revelando a distribuição das artérias principais e suas ramificações capilares, permitindo observar a distribuição capilar ao longo dos nervos periféricos em estudo.

Objetivos: Descrever a vascularização dos nervos mediano e cubital, identificando a anatomia mais frequente, assim como eventuais variações; Realizar a plastinização e diafanização das peças anatómicas a serem estudadas, com posterior aplicação como material de estudo nas aulas práticas de Anatomia e Neuroanatomia.

Métodos: Foram dissecadas as regiões braquial e antebraquial anteriores de três cadáveres humanos, identificando as principais estruturas arteriais circundantes dos nervos mediano e cubital, posteriormente submetidas a diafanização e plastinização.

Resultados: Foram criados modelos anatómicos do membro superior, com identificação dos principais vasos que participam na irrigação dos nervos em estudo, destacando ramos da artéria braquial, da artéria interóssea anterior e da artéria mediana antebraquial no nervo mediano, e ramos da artéria braquial e artéria cubital no nervo cubital.

Conclusões: É possível obter modelos anatómicos a partir de tecidos humanos preservados, que permitem o estudo neurovascular das regiões braquial e antebraquial, aplicáveis ao ensino da Anatomia, assim como contribuindo para um aumento da casuística do estudo da vascularização neuronal da região. Este projeto corresponde a um "primeiro passo" no mapeamento arterial da neuroanatomia do membro superior, a ser continuado em anos futuros.

Key-words: Brachial Plexus; Free Vascularized Nerve Grafting; Diaphanization

Background: The repair of peripheral nerve defects has become more reliable due to several microsurgical techniques. The use of free vascularized nerve graft has been reserved for exceptional cases of nerve damage, such as when the recipient nerve bed is heavily scarred as a result of ischemia or fibrosis; when the nerve gap is long; or when a transferred nerve is particularly thick, compromising its adequate blood supply.

Knowledge of the vascular supply of the peripheral nerves is still incomplete, making it necessary to describe in detail their primary arterial supply, to both improve the surgical technique and identify useful peripheral nerves to be grafted. The brachial plexus has several main terminal branches and smaller collateral nerves; due to its complexity, its detailed blood supply is scarcely described in the literature.

Plastination is a well-established technique that has been developed and implemented in the Anatomy Department of LMS, that allows the creation of clean, resistant and accurate anatomical models, which have been frequently used and well-received by students in the study of Anatomy and Neuroanatomy.

At last, diaphanization is a well-known method that allows the study of the arterial distribution of preserved specimens, complementing our investigation of the blood supply of peripheral nerves.

Objectives: To describe the blood supply of the human median and ulnar nerves, identifying the most frequent anatomy and possible variations; To apply both plastination and diaphanization techniques, creating anatomical models to be used in the study of Anatomy and Neuroanatomy;

Methods: We dissected both the brachial and antebrachial regions of three human cadavers, identifying the major arterial vessels surrounding the median and ulnar nerves. We then applied plastination and diaphanization techniques.

Results: We created anatomical models of the human upper limb. We identified the most significant vascular branches that supply the median and ulnar nerves, namely tributaries of the brachial, anterior interosseous and antebrachial median arteries for the median nerve, and branches of the brachial and ulnar arteries for the ulnar nerve.

Conclusions: It is possible to create anatomical models of preserved biologic specimens, allowing the study of the human brachial and antebrachial regions, as well as casuistically increasing our knowledge of their arterial supply. These models can be applied to the teaching of Anatomy. Our study is a "first step" towards fully mapping the arterial supply of the upper limb's peripheral nerves, to be continued in future years.

Alunos | **Students: Filipe Wolff Fernandes**

Tutores | **Tutors:** Bruno André e Silva Miranda | Miguel Vilhena Soares Coelho

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Unidade de Farmacologia Clínica, FMUL , iMM

E-mail: filipewfernandes@gmail.com

Projeto | **Project**

2017 BCHN/02

Título: Efeitos a curto e médio prazo da estimulação cerebral profunda do núcleo subtalâmico nos sintomas disautonómicos da doença de Parkinson

Title: Short-term and medium-term effects of deep brain stimulation on the subthalamic nucleus on dysautonomic symptoms in patients with Parkinson's disease

Palavras-Chave: estimulação cerebral profunda; disautonomia; doença de Parkinson

Fundamento: A Doença de Parkinson (DP) está associada com frequência e gravidade de sintomas motores e sintomas não-motores, entre os quais sintomas disautonómicos, aos quais se acrescem ainda as complicações motoras consequentes da toma de levodopa ao fim de cinco anos. A estimulação cerebral profunda é uma intervenção cirúrgica eficaz para tratar as complicações motoras, mas o seu mecanismo ainda é pouco conhecido e acompanha-se de complicações. Efeitos disautonómicos após estimulação cerebral profunda (ECP) do núcleo subtalâmico (NST) em doença de Parkinson têm sido referidos na literatura, e acredita-se que possam resultar da estimulação do hipotálamo ou das suas conexões ou das próprias áreas associativas límbicas do próprio NST que conduz a esses efeitos indirectamente. Como tal, procurou-se estudar os sintomas disautonómicos e a sua evolução em doentes com DP avançada submetidos a ECP do NST.

Objetivos: O grupo tem como objetivo primário determinar a presença, frequência e evolução dos sintomas disautonómicos em doentes com DP candidatos a ECP do NST. Como objectivos secundários, pretende-se determinar as principais manifestações disautonómicas, a sua frequência e a sua relação com localização dos eléctrodos da ECP e os seus parâmetros de estimulação usados.

Métodos: Foram estudados doentes com DP candidatos a ECP do NST no CHLN-HSM, tendo-se procedido à caracterização da doença, avaliação da alteração de sintomas disautonómicos, estudo da função sudomotora e provas disautonómicas de Ewing e Clarke em pré-operatório e pós-operatório imediato e três meses depois da cirurgia. Durante a cirurgia, foram medidos parâmetros cardiovasculares e sinais de disautonomia.

Key-words: Keywords: deep brain stimulation; dysautonomia; Parkinson disease

Background: Parkinson's disease (PD) is associated with a higher frequency and severity of motoric symptoms and non-motoric symptoms, including dysautonomic symptoms, with motoric complications resulting from the consumption of levodopa after five years. Deep brain stimulation is an effective surgical intervention to treat motoric complications, but its' mechanism is still poorly understood and is accompanied by complications. Dysautonomic effects after subthalamic nucleus (STN) deep brain stimulation (DBS) in Parkinson's disease have been reported in the literature, and are believed to result from stimulation of the hypothalamus or its connections or from the limbic associative areas of the STN itself, indirectly leading to these effects. Therefore, the presence, frequency and evolution of dysautonomic symptoms were studied in patients with advanced PD undergoing DBS on STN.

Objectives: The primary objective of this group is to determine the presence, frequency and evolution of dysautonomic symptoms and, as a secondary objective, to determine the main dysautonomic manifestations, frequency and relation to the location of DBS electrodes and their stimulation parameters used.

Methods: We studied patients with PD who were candidates for DBS on STN in CHLN-HSM with disease characterization, evaluation of dysautonomic symptoms change, study of sudomotor function and dysautonomic tests of Ewing and Clarke in the preoperative and immediate postoperative periods and three months after surgery. During surgery, cardiovascular parameters and signs of dysautonomia were measured.

Alunos | **Students:** Sara Daniela Botelho Rosa

Tutores | **Tutors:** Maria José de Oliveira Diógenes, Rita Belo (este trabalho encontra-se inserido no projeto de doutoramento da aluna Rita Belo sob orientação de Ana Maria Sebastião, Miguel Castanho, Vera Neves e Maria José Diógenes)

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Instituto de Farmacologia e Neurociências // Institute of Pharmacology and Neurosciences

E-mail: sararosa@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

OPI

Título | **Title:** Estudo exploratório acerca dos efeitos da KTP e KTP-NH2 na função sináptica // Exploratory study regarding the effects of KTP and KTP-NH2 on synaptic function

Palavras-Chave: Quiotorfina (KTP); Doença de Alzheimer (DA); Sinapse

Fundamento: A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, precedida por disfunção sináptica causada por aglomerados oligoméricos solúveis de proteína β amilóide ou Abeta (Selkoe, 2002, Science). Verificou-se que doentes com DA apresentam níveis diminuídos de Quiotorfina (KTP), no líquido cefalorraquidiano (Santos et al, 2013, Frontiers in aging neuroscience), sendo que esta observação motivou o estudo da KTP como possível alternativa farmacológica na terapêutica da DA. Apesar da KTP estar descrita como um dipéptido endógeno (Tirosil-Arginina) com propriedades analgésicas, o seu mecanismo de acção ainda não é totalmente conhecido, existindo evidências que sugerem um papel neuromodulatório (Takagi et al, 1980, Brain Research). Sendo a KTP um péptido hidrofílico, foi desenvolvida a Quiotorfina amidada (KTP-NH2), um derivado mais lipofílico capaz de ultrapassar a barreira hemato-encefálica (Santos et al, 2016, Frontiers in pharmacology).

Objetivos: O presente estudo visa avaliar o efeito da KTP e da KTP-NH2, por um lado, na transmissão sináptica basal em condições fisiológicas, e por outro, no número de protusões neuronais, tanto na presença, como na ausência do péptido Abeta25-35.

Métodos: De forma a testar a transmissão sináptica basal, foram registados potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo (fEPSP) na área CA1 hipocampal de ratinhos adultos C57BL/6J, incubada com concentrações crescentes (de 5nM a 5 mM) de KTP ou KTP-NH2. Para estimar o número de protusões neuronais, utilizaram-se culturas primárias de neurónios incubadas com 50nM de ambos os péptidos e com 25µM de Abeta25-35, durante 24 horas. Os dados foram analisados através do teste estatístico One-way ANOVA com um posthoc Dunnett teste.

Resultados: Concentrações crescentes de ambos os péptidos mostraram um efeito dependente da concentração na modulação da transmissão sináptica excitatória. A KTP aumentou a transmissão sináptica basal com um efeito significativo a 50 nM (fESPS amplitude [% baseline] = 11,46±3.0%, n=6, p-value < 0,0001), enquanto que a KTP-NH2 diminuiu-a gradualmente com efeito significativo a 50µM (fESPS amplitude [% baseline] = -27,6±8,1%, n=6, p value = 0,016).

Apesar de se observar uma tendência para diminuição das protusões neuronais em neurónios incubados com KTP, KTP-NH2 e Abeta25-35, os efeitos não são significativos (n=3).

Conclusões: A KTP e a KTP-NH2 mostraram efeitos opostos na transmissão sináptica basal, o que pode ser resultado de diferentes mecanismos de ação ou de diferentes propriedades farmacocinéticas.

São necessários mais estudos para melhor compreender os mecanismos de acção de ambos os péptidos e esclarecer os seus efeitos sobre a ação tóxica do Abeta, nomeadamente no que concerne ao número de protusões neuronais.

Key-words: Kyotorphin (KTP); Alzheimer's Disease (AD); Synapse

Background: Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disease, preceded by synaptic dysfunction caused by soluble oligomeric assemblies of the amyloid β protein or Abeta (Selkoe, 2002, Science). It was verified that patients with AD showed decreased levels of Kyotorphin (KTP), in the cerebro-spinal fluid (Santos et al, 2013, Frontiers in aging neuroscience). This observation motivated the exploit of KTP as a new pharmacological alternative. Although KTP is described as an endogenous dipeptide (Tyrosyl-Arginine) with analgesic properties, its mechanism of action is not yet entirely known, with some evidence suggesting a neuromodulatory role (Takagi et al, 1980, Brain Research). Given KTP's hydrophilic nature, amidated Kyotorphin, KTP-NH2 was developed, a more lipophilic derivative that is able to cross the blood-brain barrier (Santos et al, 2016, Frontiers in pharmacology).

Objectives: The present study intends to evaluate the effect of both KTP and KTP-NH2, on one hand, on basal synaptic transmission at physiological conditions, and on the other hand, on the number of neuron's protusions, in the presence and absence of the Abeta25-35 peptide.

Methods: In order to test basal synaptic transmission, field excitatory post-synaptic potentials (fEPSP) were recorded on CA1 hippocampal area of adult C57BL/6J mice, incubated with increasing concentrations (5nM to 5mM) of KTP or KTP-NH2. So as to assess the number of neuron's protusions, neuronal primary cell cultures were incubated with 50nM of both peptides and with 25µM of Abeta25-35, during 24 hours. Data was subsequently analysed using the statistical test One-way ANOVA with posthoc Dunnett test.

Results: Increasing concentrations of both peptides showed a concentration-dependent effect on the modulation of excitatory synaptic transmission. KTP increased the basal synaptic transmission, reaching a significant effect at 50 nM (fESPS amplitude [% baseline] = 11,46±3.0%, n=6, p-value < 0,0001), whereas KTP-NH2 gradually decreased it with significant effect at 50µM (fESPS amplitude [% baseline] = -27,6±8,1%, n=6, p value = 0,016).

Although there's a tendency towards the decrease of neuron's protusions in neuron's incubated with KTP, KTP-NH2 and Abeta25-35, these effects aren't significative (n=3).

Conclusions: KTP and KTP-NH2 showed opposite effects on basal synaptic transmission, which can be a result of different mechanisms of action or different pharmacokinetic properties.

Further research should be done in order to better understand the mechanisms of action of both peptides and clarify their effects on Abeta's toxic action, namely regarding the number of neuron's protusions.

Alunos | **Students:** Ana Catarina Cordeiro Correia; David Gonçalves Paixão

Tutores | **Tutors:** João Luís Cavaco; Ivo Álvares Furtado

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Instituto de Anatomia, FMUL / Anatomy Institute, FMUL

E-mail: anacatarina1997@hotmail.com; dpaixao@campus.ul.pt

Projeto | **Project**

2017 PEC/21

Título: Bases Anatómicas da Metastização Neuronal de Adenocarcinoma da Mama para o Plexo Braquial

Title: Anatomical Basis of Neural Spread of Breast Adenocarcinoma to the Brachial Plexus

Palavras-Chave: Plexo Braquial; Adenocarcinoma da Mama; Metastização Neuronal

Fundamento: A plexopatia braquial focal em contexto de adenocarcinoma da mama pode apresentar diversas etiologias, incluindo infiltração metastática do tumor primário, que se julga subdiagnosticada. O conhecimento da anatomia da região é fundamental para o diagnóstico, pois 85% dos doentes apresentam como sintoma inicial dor moderada que segue uma distribuição em dermátomo. Esta dor é, geralmente, o primeiro sintoma a surgir, frequentemente precedendo outra sintomatologia de maior gravidade, por até 9 meses.

A concretização do fenómeno da metastização tumoral depende das propriedades intrínsecas da célula neoplásica, assim como das do microambiente a ser infiltrado. Uma via de metastização que tem vindo a ser estudada recentemente corresponde à disseminação ou invasão intra- e peri-neurais, associada a pior prognóstico, e possivelmente mais frequente do que previamente reportado. Assim, o seu significado clínico continua a ser subestimado.

Diversas vias anatómicas poderão explicar a metastização da neoplasia mamária por infiltração neuronal e consequente disseminação pelo plexo braquial; todavia, a sua descrição na literatura é escassa. A via anatómica mais provavelmente utilizada corresponde ao nervo intercostobraquial, que contribui para a inervação superficial da glândula mamária, e que poderá comunicar com o plexo braquial. As diversas e variáveis comunicações entre os ramos colaterais do plexo braquial, assim como aquelas estabelecidas entre estes e outros nervos periféricos, poderão justificar a grande variedade de sintomatologia inicial.

Objetivos: Descrever a anatomia nervosa das regiões mamária, supra-clavicular e axilar, identificando anastomoses entre os vários ramos, de forma a mapear possíveis vias anatómicas de metastização tumoral; Criar um atlas fotográfico com apoio textual como material de estudo a ser usado nas aulas de Anatomia e Neuroanatomia.

Métodos: Foram dissecadas as regiões mamária, axilar e supraclavicular de três cadáveres humanos, com identificação das principais estruturas nervosas superficiais e profundas.

Resultados: Identificámos as principais anastomoses entre ramos dos nervos supraclaviculares (plexo cervical superficial), 2º-5º intercostais anteriores, ramos laterais dos intercostais posteriores, longo torácico e intercostobraquial (plexo braquial). Fotografámos as principais estruturas nervosas de cada plano musculofascial, posteriormente legendadas para criação de documentos de apoio a serem usados nas aulas práticas e eventuais sessões de disseção do Instituto de Anatomia.

Conclusões: Foram identificadas anastomoses entre vários ramos nervosos, mais frequentes nas transições entre as regiões mamária, axilar e supra-clavicular, contribuindo para um aumento da casuística do estudo da inervação da região. Um melhor conhecimento da anatomia permitirá uma melhor compreensão da fisiopatologia e sintomatologia neurológica periférica, e, consequentemente, um diagnóstico mais precoce e tratamento mais dirigido, com melhoria do prognóstico.

Key-words: Brachial Plexus; Breast Adenocarcinoma; Neural Spread

Background: In patients with breast adenocarcinoma, focal brachial plexopathy may be attributable to several causes, including metastatic spread and infiltration of the primary tumor, which is thought to be underdiagnosed. A detailed knowledge of the neural anatomy of the region is necessary for the diagnosis, as 85% of patients with tumor infiltration present with moderate pain with a dermatomal distribution, often preceding other neurologic signs or symptoms, often more severe, for up to 9 months.

Metastatic spread of a tumor depends of the intrinsic properties of the neoplastic cell, as well as those of the microenvironment to be infiltrated. Tumor intra- and peri-neural invasion is associated with poorer prognosis, and is more frequent than suspected. Its clinical significance remains underestimated.

Several anatomical routes of neural spread of a primary breast carcinoma to the brachial plexus have been hypothesized; however, their detailed description is lacking. The most likely pathway is via the intercostobrachial nerve, which supplies part of the superficial gland and overlying skin. Furthermore, several and variable communications between branches of the brachial plexus and other neighboring peripheral nerves may account for several neurological symptoms.

Objectives: To describe the neural anatomy of the mammary, supraclavicular and axillary regions, identifying possible anastomosis between branches as to map possible anatomical pathways for neural spread; To create a text and photographic atlas as new material to be used in the study of Anatomy and Neuroanatomy.

Methods: We dissected the mammary, axillary and supraclavicular regions of three human cadavers, identifying the major superficial and deep peripheral nerves.

Results: We identified the main anastomosis between branches of the supraclavicular (superficial cervical plexus), 2th-5th anterior intercostals, lateral cutaneous branches of posterior intercostals, long thoracic and intercostobrachial nerves (brachial plexus). We photographed and labeled the main peripheral nerves of each dissection plane, to create new support material to be used in classes and future dissection sessions of our Anatomy Department.

Conclusions: We identified anastomosis between several nerve branches, more numerous in the transitions between the mammary, axillary and supraclavicular regions, casuistically increasing our knowledge of their neural supply. Understanding the anatomy gives insight into the pathophysiology and peripheral nerve symptoms of neural spread which, in the future, may allow earlier diagnosis and improve treatment, as well as its prognosis.

Alunos | **Students:** Mariana Alves Vargas

Tutores | **Tutors:** Ana Catarina Gapar Fonseca

Laboratório, Centro ou Unidade | **Laboratory, Centre, Unit:** Clínica Universitária de Neurologia | Neurology University Clinic

E-mail: mariana.a.vargas@gmail.com

Projeto | **Project**

2017 BCHLN/01

Título: Validação do score FABS para o diagnóstico de "falsos AVCs" no serviço de urgência numa coorte de pacientes portugueses

Title: Validation of the FABS score to identify stroke mimics on the emergency department in a Portuguese patient cohort

Palavras-Chave: FABS, "falsos AVCs", AVC

Introdução: A distinção entre AVCs e "Falsos AVCs" no serviço de urgência nem sempre é evidente. O score FABS foi desenvolvido nos estados Unidos para identificar no serviço de urgência os pacientes com uma maior probabilidade de serem "Falsos AVCs". Pretendemos com este estudo avaliar a sua performance na *cohort* dos pacientes internados na Unidade de AVC do Hospital Santa Maria.

Métodos: **O score** FABS score consiste em 6 variáveis, sendo atribuído um ponto por cada variável presente: ausência de parésia facial, ausência de fibrilação auricular, idade inferior a 50 anos, pressão arterial sistólica<150mmHg à entrada no serviço de urgência, convulsões e sintomas sensitivos isolados. O *cuttoff* do score é FABS≥3.

Analisámos retrospetivamente a base de dados da unidade de AVC de 2007-2013. Todos os "falsos AVCs" foram incluídos. Os "falsos AVCs" foram emparelhados com pacientes com AVC distribuídos de forma equitativa ao longo dos anos e selecionados de forma aleatória. Obteve-se a curva ROC e a estatística C-statistics. A significância estatística foi definida como p<0.05

Resultados: Foram incluídos 409 pacientes, dos quais 221(54.1%) eram" falsos AVCs". 63% dos falsos AVCs foram diagnosticados no serviço de urgência como AVCs da circulação Posterior. O valor da estatística-C foi 0.83(95%[CI],0.79–0.87). Um valor do score FABS≥3 identificou "falsos AVCs" com uma sensibilidade de 65%(60.5%-69.5%) uma especificidade de 86%(83.8%-90.2%), valor preditivo positivo 84%(80.6%-87.5%), valor preditivo negativo 67.3% (65%-73.8%). Após a exclusão dos pacientes com a hipótese de diagnóstico de AVC da circulação posterior verificou-se um aumento da sensibilidade e especificidade do score: estatística-C 0.9(0.85–0.94) sensibilidade 71%(64% - 77.1%) e especificidade 90% (86%-94%).

Consclusão: **O score** FABS apresenta uma boa acuidade na identificação de pacientes com AVC e Falsos AVCs num coorte de pacientes portugueses. Esta acuidade é inferior à reportada no estudo original o que poderá ser devido à diferente população e contexto de aplicação do score.

Key-words: FBAS, Stroke, Strokes mimics

Introduction: Distinguishing between stroke or a mimic in the emergency department can be difficult. The FABS score was developed in the USA to identify patients that are more likely to be stroke mimics in the emergency department. We aimed to evaluate its performance in a *cohort* of patients admited to the Stroke Unit od Hospital de Santa Maria.

Methods:FABS score consists of 6 variables, one point for each present variable: absence of facial droop, absence of atrial fibrillation, age less than 50 years, systolic blood pressure<150mmHg at presentation, seizures and isolated sensory symptoms. The cutoff is FABS≥3.

We retrospective analyzed a stroke unit database from 2007-2013. All mimics were included. We paired mimics with stroke patients equally distributed across the years and randomly selected. ROC curve and C-statistics were obtained. Statistical significance was set at p<0.05

Results: 409 patients were included, 221(54.1%) were mimics. 63% mimics had a provisional diagnostic hypothesis of posterior circulation stroke. C-statistic was 0.83(confidence interval 95%[CI],0.79–0.87). FABS≥3 identified stroke mimics with a 65%(60.5%-69.5%) sensitivity and a 86%(83.8%-90.2%) specificity, positive predictive value 84%(80.6%-87.5%), negative predictive value 67.3% (65%-73.8%). After the exclusion of patients with the diagnostic hypothesis of posterior circulation stroke there was an increase in sensitivity and specificity of the score: C-statistics was 0.9(0.85–0.94) 71%(64% - 77.1%) sensitivity and 90% (86%-94%) specificity.

Conclusion: FABS had a good acuity to identify stroke patients and stroke mimics in a Portuguese patient *cohort*. This acuity was inferior to the one reported in the original study which can be due to the different population and context of the score application.

RESEARCH PATHS

Choosing to be a Clinician Scientist to improve our understanding of food allergy

Biography

Dr Alexandra F. Santos

Dr. Alexandra F. Santos is a Senior Clinical Lecturer and MRC Clinician Scientist at King's College London and an Honorary Consultant in Paediatric Allergy at Guy's and St Thomas' Hospital NHS Foundation Trust. Her current position allows her to combine clinical care for children with allergic disease with research in the laboratory looking into the Immunology behind these conditions, particularly food allergy. Alexandra qualified in Medicine from the University of Coimbra in 2002 and trained in Allergy and Clinical Immunology at Coimbra University Hospital. In 2009, she entered the Advanced Programme for Medical Education (Director: Professor Leonor Parreira), sponsored by Fundacao Calouste Gulbenkian, Fundacao Champalimaud, Ministerio da Saude and Fundacao para a Ciencia e a Tecnologia, and subsequently completed a PhD in Allergy and Immunology at King's College London, supervised by Professor Gideon Lack. The focuses of her thesis were diagnostic markers of clinical allergy versus sensitisation to peanut, in which she developed and validated a new diagnostic test for peanut allergy, the basophil activation test, and explored the immune mechanisms underlying allergy and tolerance in IgE-sensitised children. Alexandra has received prestigious awards from the Medical Research Council (MRC) in the UK, including an MRC Centenary Early Career Award and an MRC Clinician Scientist Fellowship. She has also obtained funding from the Immune Tolerance Network/NIAID in the USA for her work in the LEAP Study. Alexandra has been very active in the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and in the Portuguese Society of Allergy and Clinical Immunology. She is currently a member of the board of the Food Allergy Interest Group of the EAACI. Alexandra teaches at the KCL Allergy Academy and has been an invited speaker at many international congresses. Alexandra has published in high-impact journals such as Journal of Allergy and Clinical Immunology and the New England Journal of Medicine. Her main research interests are: food allergy, anaphylaxis, allergy diagnosis and allergy prevention.

RESEARCH TOOLS

IBM Watson: Big Data, Cognitive Computing and Personalized Medicine

Biography

Frederico Muñoz | IBM

Frederico Muñoz é Chief Architect da IBM Portugal com uma experiência diversificada em termos de desenho de soluções, *Enterprise Architecture*, programação e data science. Nos últimos anos tem liderado e participado em projectos de *Smarter Cities*, *Internet of Things* e na análise e desenvolvimento de soluções cognitivas e analíticas aplicadas a diversas áreas, incluindo a área da saúde com Watson Healthcare.

É membro do IBM *Technical Expert Council* para Espanha, Portugal, Israel e Grécia e certificado *Master Certified Architect* pelo The Open Group.

Organização

GAPIC
Gabinete de Apoio à Investigação Científica, Tecnológica e Inovação

Prof.ª Doutora Ana Espada de Sousa
Prof. ª Doutora Cláudia Faria
Prof.ª Doutora Susana Mendes Fernandes
Prof. Doutor Ricardo Fernandes
Mestre Sónia Barroso
Mestre Sónia Teixeira

aefml
associação de estudantes da faculdade de medicina de lisboa

Departamento Formação e Ciência

Apoios:

AIMS MEETING

Corrida saúde + solidária

ACTA MÉDICA PORTUGUESA STUDENT

URPC
Unidade Relações Públicas e Comunicação