

## INDICE

**Centro de Cardiologia**

|   |   |
|---|---|
| Padrões Ecocardiográficos em Doentes com Dispneia ou Cansaço<br><i>Miguel Vasco Marques</i> | 3 |
|---|---|

**Clínica Universitária de Doenças Infecciosas**

|   |   |
|---|---|
| Avaliação de um teste rápido para o diagnóstico simultâneo de tuberculose e de infecção por VIH<br><i>Sara Lino, Margarida Matias, Tânia Alexandra Monteiro</i>                                       | 5 |
| Papel do teste de Mantoux no diagnóstico de infecção latente por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e na detecção de seroconversão em estudantes universitários<br><i>Sara Ramalho, Andreia Seixas</i> | 7 |

**Instituto de Anatomia**

|  |    |
|--|----|
| Estudo Comparado Anatomia/IRM do Volume do Corpo Amigdalino Humano<br><i>Carolina Isabel Gonçalves, Francisco José Santos, Marta Patrícia Nogueira</i> | 9  |
| Distribuição dos receptores $\beta_2$ adrenérgicos no Locus Ceruleus Humano<br><i>Joana Adelaide Regala, José Manuel Pinto, Maria Manuel Santos</i>    | 11 |

**Instituto de Biopatologia Química**

|   |    |
|---|----|
| Influência do ditiotreitól no mecanismo de transdução de sinal do NO, mediado pela banda 3<br><i>Ana Catarina Bia</i> | 13 |
| Alterações hemorreológicas na Diabetes Mellitus - importância do controlo metabólico<br><i>Bruno Miguel Carrilho</i>  | 15 |

**Instituto de Farmacologia e Neurociências**

|  |    |
|--|----|
| Estudo dos Mediadores contrácteis dependentes da COX-1 e da COX-2 na actividade do NO no rim isolado perfundido do rato<br><i>Luís Alexandre Pinto</i> | 17 |
| Estudo da Anemia em Doentes com Insuficiência Cardíaca Crónica: Avaliação da Patogenicidade da Hormona Antidiurética<br><i>João Miguel Marques</i>     | 19 |

**Instituto de Fisiologia**

Estudo da variabilidade da pressão vesical  
*Sérgio Miguel Laranjo*

21

---

**Instituto de Medicina Molecular**

Caracterizar a degradação da forma wild-type e de formas causadoras de  
amiloidose da lisosima humana.  
*Rui Pedro Costa*

23

Detecção de formas de topoisomerase II $\alpha$  conjugadas com Sumo  
*Hugo André Bastos*

25

---

**Laboratório de Microbiologia**

*Staphylococcus* coagulase-negativos isolados em hemoculturas: bacteriemia ou  
contaminação?  
*João Miguel Alves*

27

Alunos: Marques M.

Tutores: Lopes MG.

Laboratório, Centro ou Unidade: Centro de Cardiologia - Universidade Lisboa

Telefone: 917287290 Fax: 217960602 E-mail: mglopes@fm.ul.pt

Título: Padrões Ecocardiográficos em Doentes com Dispneia ou Cansaço

Palavras-Chave: sintomas; função ventricular esquerda; ecocardiografia

**Fundamento:** Os sintomas são a base da prática médica sendo importante re-definir o seu significado clínico face aos novos métodos de diagnóstico.

**Objectivos:** Definir o contributo da ecocardiografia transtorácica (ECOCCG) para identificar patologia cardíaca que possam justificar os sintomas de dispneia ou cansaço e que conduzam a "janelas terapêuticas" eficazes.

**Métodos:** Seleccionamos retrospectivamente exames ECOCCG consecutivos enviados para esclarecimento das queixas de dispneia ou cansaço, realizados entre 1998 e 2004 por um mesmo operador. Identificamos um total de 272 estudos, pertencentes a 267 doentes (dtes) 70 (25,7%) por dispneia e 202 (74,3%) por cansaço, 96 dtes (36,0%) homens e 171 dtes (64%) mulheres. Proveniência dos dtes: 267 doentes eram ambulatoriais (98,2%) e 5 estavam internados (1,8%).

Cada ECOCCG foi classificado a 3 níveis: 1) avaliação global (normal, *borderline* ou anormal); 2) estudo anatómico do ventrículo esquerdo (normal, hipertrofia, dilatação ou ambos); 3) estudo da função sistólica do ventrículo esquerdo (normal, *borderline* ou anormal).

Estatística: teste  $\chi^2$  e teste t de student. Grau de significância  $p < 0,05$ .

**Resultados:** A análise estatística da distribuição dos exames globalmente normais (n=141 - 51,8%), *borderline* (n=22 - 8,1%) e anormais (n=109 - 40,1%) nos 2 grupos (dispneia e cansaço) revelou que não existiam diferenças estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) pelo que a população será estudada em conjunto.

Nos exames 247 dtes apresentavam ritmo sinusal (90,8%), 20 dtes apresentavam fibrilhação auricular (7,4%) e 5 dtes apresentavam ritmo pacemaker (1,8%). Todos os exames com ritmos não sinusal apresentaram exames globalmente anormais.

O VE (anatomicamente) era normal em 185 estudos (68%) e em 87 estudos (32%) tinham hipertrofia, dilatação ou ambos. No estudo funcional do VE verificamos que a função sistólica era normal em 255 estudos (93,8%), em 9 (3,3%) era anormal e em 8 estudos (2,9%) era *borderline*, sem diferenças entre os dtes com dispneia ou cansaço.

Os factores que aumentaram a probabilidade de se encontrarem alterações ECOCCG foram: situação de doente internado, ritmo não sinusal e grupo etário  $> 65$  anos de idade.

Em 175 exames (64,3%) os dtes apresentavam excesso de peso ou obesidade.

**Conclusões:** Os sintomas dispneia e cansaço, numa população maioritariamente com excesso de peso, revelaram-se equivalentes do ponto de vista das alterações anatómicas e funcionais identificadas por ECOCCG. A grande maioria dos dtes ambulatoriais em ritmo sinusal não apresentavam alterações significativas. A disfunção sistólica do ventrículo esquerdo foi rara ( $< 7\%$ ).

Students: Marques M.

Tutors: Lopes MG.

Laboratory, Centre, Unit: Centro de Cardiologia - Universidade Lisboa

Phone: 917287290

Fax: 217960602

E-mail: mglopes@fm.ul.pt

---

Title: Echocardiographic patterns associated with dyspnea or fatigue

---

Key-words: symptoms; left ventricular function; echocardiography

---

**Background:** symptoms are the base of current medical practice and it's important to redefine their clinical meaning facing the new methods of diagnosis.

**Objectives:** to define the transthoracic echocardiography (ECOCCG) contribution for the identification of cardiac pathology that could justify the symptoms dyspnea or fatigue and that could point to efficient therapeutics.

**Methods:** we selected, retrospectively, consecutive ECOCCG exams of patients that were sent to clarify the symptoms dyspnea or fatigue. All the exams were performed by the same operator between 1998 and 2004. A total of 272 exams were identified from 267 patients, 70 (25,7%) exams belong to patients with dyspnea and 202 (74,3%) belong to patients with fatigue. 96 (36%) patients were man and 171 (64%) were women. 267 (98,2%) patients were ambulatory and only 5 pts (1,8%) were in hospital.

Each ECOCCG was classified in 3 levels: 1) global evaluation (normal, borderline or abnormal); 2) left ventricular anatomic evaluation (normal, hypertrophied, dilated or both); 3) left ventricular systolic function (normal, borderline or abnormal).

Statistics:  $\chi^2$  and student t test. Significance level  $p < 0,05$ .

**Results:** the distribution of the global normal exams (n=141 – 51,8%), global borderline exams (n=22 - 8,1%) and global abnormal exams (n=109 - 40,1%) in both groups (dyspnea e fatigue) revealed that there were no statistical significant difference ( $p > 0,05$ ) and because of this fact the population was studied as one.

In 247 (90.8%) exams the patients were in sinus rhythm, 20 (7,4%) presented auricular fibrillation rhythm and 5 (1,8%) presented pacemaker rhythm. All the exams with non sinusal rhythms were in the group of globally abnormal exams.

Left ventricle anatomy was normal in 185 (68%) exams, in 87 (32%) exams was hypertrophied, dilated or both. The left ventricle functional evaluation revealed that the systolic function was normal in 255 (93,8%) exams, abnormal in 9 (3,3%) and borderline in 8 (2,9%). There was no difference between patients with dyspnea or fatigue.

The probability of abnormal findings in the ECOCCG exams was related with: inpatient, non sinusal rhythm and patients with > 65 years old.

In 175 (64,3%) exams the patients were overweight or obese.

**Conclusions:** the symptoms, dyspnea and fatigue, in this population, were equivalent in relation to the anatomical and functional abnormalities identified with ECOCCG. The great majority of ambulatory patients in sinus rhythm didn't present significant abnormalities. Left ventricular systolic dysfunction was rare (<7%).

Alunos: Lino S, Matias M, Monteiro T.

Tutores: Valadas E

Laboratório, Centro ou Unidade: Clínica Universitária de Doenças Infecciosas

Telefone: 217805274 Fax: 217806242 E-mail: evaladas@fm.ul.pt

Título: Avaliação de um teste rápido para o diagnóstico simultâneo de tuberculose e de infecção por VIH

Palavras-Chave: tuberculose, VIH, diagnóstico

**Fundamento:** A tuberculose (TB) e a infecção por VIH continuam a ser as causas de internamento mais frequentes no Serviço de Doenças Infecciosas (SDI) do Hospital de Santa Maria. O exame directo da expectoração é a única técnica simples, rápida e pouco dispendiosa para o diagnóstico da TB. No entanto, o exame microscópico da expectoração (coloração de Ziehl-Neelsen) tem uma baixa sensibilidade (60-70%) no diagnóstico de TB pulmonar, quando comparada com os exames culturais. Esta sensibilidade é ainda inferior se houver infecção por VIH associada. Por outro lado, são necessárias cerca de 24 horas para o diagnóstico convencional de infecção por VIH. A aplicação de um teste de diagnóstico de TB, rápido e com sensibilidade e especificidade elevadas, poderia facilitar a identificação dos doentes com TB pulmonar, permitir o tratamento mais precoce e diminuir o risco de transmissão da doença. Este teste deveria ser baseado na detecção de anticorpos contra determinados antígenos da micobactéria, ser tecnicamente simples, rápido, barato e não deveria depender da existência de expectoração. As mesmas vantagens e aplicar-se-iam a um teste para infecção por VIH.

**Objectivos:** Diagnosticar a infecção por VIH e TB nos doentes internados no Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital de Santa Maria, usando um teste rápido, barato e que permitisse o diagnóstico de ambas as situações no primeiro dia de internamento; determinar o valor predictivo deste teste no diagnóstico de TB e de infecção por VIH; determinar o impacto destes resultados no prognóstico do doente.

**Métodos:** Os testes serão aplicados a todos os doentes internados no SDI do Hospital de Santa Maria durante seis meses consecutivos. Serão realizados nas primeiras 24 horas de internamento, logo após consentimento informado e preenchimento de um questionário onde serão recolhidos dados demográficos e clínicos. O sangue será obtido por picada digital. A amostra será colocada numa *cassette*, juntamente com uma lução tampão e o resultado será lido ao fim de alguns minutos. Os médicos assistentes serão informados acerca do resultado dos testes, imediatamente a seguir à sua realização. A confidencialidade dos resultados será mantida.

**Resultados esperados:** Espera-se poder determinar o valor predictivo destes testes, realizados à "cabeceira do doente" no diagnóstico de infecção por VIH e/ou TB, de forma a poder avaliar a possibilidade de poderem ser usados como exames complementares de diagnóstico de rotina.

Atendendo a que a decisão da Comissão de Ética foi demorada, este trabalho só será iniciado em Outubro de 2005.

*Students:* Lino S, Matias M, Monteiro T.

*Tutors:* Valadas E.

*Laboratory, Centre, Unit:* Clínica Universitária de Doenças Infecciosas

*Phone:* 217805274

*Fax:* 217806242

*E-mail:* evaladas@fm.ul.pt

---

*Title:* Evaluation of a rapid diagnostic test for the simultaneous diagnosis of tuberculosis and HIV infection

---

*Key-words:* tuberculosis, HIV, diagnosis

---

**Background:** Tuberculosis and HIV infection continue to be one of the most frequent causes of hospitalisations in the Department of Infectious Diseases, Hospital Santa Maria. Examination of stained sputum smears is the only rapid and cost effective method to diagnose TB. However, microscopic examination of sputum samples has a low sensitivity (60-70%) in the diagnosis of pulmonary TB, when compared to culture. In cases of HIV TB co-infection this sensitivity may be even lower. On the other hand, the laboratory diagnosis of HIV takes at least 24 hours, when using conventional diagnostic methods. The use of a diagnostic test for TB, that has high sensitivity and specificity, facilitates the identification of individuals with TB, thus allowing their rapid treatment and the reduction of further transmission. This test should be based on the detection of antibodies against specific mycobacterial antigens, technically easy, rapid, not expensive, and should not depend on the presence of sputum. The same advantages should apply for a rapid test to diagnose HIV infection.

**Objectives:** To diagnose HIV and TB infection, with a single rapid test, in patients admitted to the Department of Infectious Diseases, Hospital Santa Maria, during the first 24 hours after hospitalisation. To determine the predictive value of this test for the diagnosis of TB and HIV infection, as well as assess the impact that these results may have in patient management.

**Methods:** The tests will be done on all patients admitted to the Department of Infectious Diseases, Hospital de Santa Maria during 6 consecutive months. Tests will be carried out in 24 hours following hospitalisation, after obtaining informed consent, accompanied by a questionnaire with demographic and clinical data. Blood obtained by fingerprick will be applied in a cassette, followed by some drops of a buffer. The result can be read after a few minutes. The physician of the patient will be informed of the test result immediately after it is known. Confidentiality of the results will be assured throughout the study.

**Expected Results:** It is expected that these results allow to determine the predictive value of these bedside tests for the diagnosis of HIV and/or TB. This will allow to reach a conclusion whether these tests are useful as supplementary diagnostic tests in routine conditions.

Due to a delayed ethical approval, this study will only start in October 2005.

Alunos: Ramalho S, Seixas A.

Tutores: Valadas E.

Laboratório, Centro ou Unidade: Clínica Universitária de Doenças Infecciosas

Telefone: 217805274 Fax: 217806242 E-mail: evaladas@fm.ul.pt

Título: Papel do teste de Mantoux no diagnóstico de infecção latente por *Mycobacterium tuberculosis* e na detecção de seroconversão em estudantes universitários

Palavras-Chave: tuberculose, Mantoux, seroconversão

**Fundamento:** A tuberculose (TB) continua ser a primeira causa de morte, em adultos e, na Europa Ocidental, Portugal é o país com a mais elevada taxa de TB. Também preocupante é a elevada incidência de TB nos profissionais de saúde, bem como a existência de TB nosocomial em Hospitais portugueses. Os estudantes de Medicina estão expostos a doentes com TB pulmonar e, atendendo à organização da Licenciatura em Medicina, é aceite que a exposição a *Mycobacterium tuberculosis* seja mais intensa nos últimos anos, o que se deveria reflectir numa maior positividade do teste de Mantoux.

**Objectivos:** Determinar qual a resposta ao teste de Mantoux em estudantes de Medicina ao longo da Licenciatura; investigar qual a relação entre o resultado deste teste e vacinação prévia com BCG ou com TB no passado; investigar qual a capacidade do teste de Mantoux em determinar a probabilidade de infecção recente por *M. tuberculosis*; contribuir para uma mais correcta implementação de medidas de controlo da TB a nível hospitalar, de forma a poder diminuir o risco de infecção por *M. tuberculosis*.

**Métodos:** Serão incluídos 400 alunos de Medicina, do 1º ano e do 5º ano, que voluntariamente queiram participar no estudo. O teste de Mantoux (administração intradérmica de tuberculina na face anterior do antebraço esquerdo) será realizado em simultâneo com a aplicação de um questionário, onde, além de dados demográficos, constem o tipo e a duração dos estágios realizados pelos alunos, se houve ou não contacto com doentes bacilíferos, vacinação com BCG, antecedentes pessoais de TB e existência de factores que possam influenciar o resultado do teste (diabetes, terapêutica com corticóides e outros). O resultado do teste de Mantoux (diâmetro da induração na zona de administração de tuberculina) será lido às 48 horas.

**Resultados esperados:** Espera-se encontrar uma maior percentagem de reacções de Mantoux positivas no grupo de alunos do 5º ano da Licenciatura em Medicina, em comparação com o grupo de alunos do 1º ano. Embora não se trate de um estudo longitudinal do mesmo grupo de alunos, se a diferença encontrada entre os dois grupos for estatisticamente significativa, poderá significar que há transmissão nosomial de *M. tuberculosis*. Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho possam contribuir para um melhor controlo da infecção por *M. tuberculosis* no Hospital de Santa Maria. Além disso, e como em Portugal os estudos de prevalência de infecção latente por *M. tuberculosis* são escassos, os resultados deste estudo poderão contribuir para um melhor conhecimento da realidade nacional. Este aspecto poderá ser especialmente importante numa altura em que se discute a possibilidade de iniciar quimioprofilaxia para TB em alguns grupos específicos.

Atendendo a que a decisão da Comissão de Ética foi demorada, este trabalho só será iniciado em Outubro de 2005.

Students: Ramalho S, Seixas A.

Tutors: Valadas E.

Laboratory, Centre, Unit: Clínica Universitária de Doenças Infecciosas

Phone: 217805274

Fax: 217806242

E-mail: evaladas@fm.ul.pt

---

**Title:** Usefulness of the Mantoux test for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection and seroconversion in university students

---

**Key-words:** tuberculosis, Mantoux, seroconversion

---

**Background:** Tuberculosis (TB) continues to be the leading infectious cause of death in adults and, in West Europe, Portugal has the highest incidence rate of TB. Furthermore the high rate of nosocomial TB in Portuguese Hospitals, associated with a high incidence of TB in health care professionals is of great concern. Medical students are exposed to *Mycobacterium tuberculosis* when seeing TB patients, and the organization of the medical course means that students have a higher risk of exposure towards the end of their course. This ought to be reflected by an increase in positive Mantoux reactions.

**Objectives:** To determine the result of the Mantoux reaction in medical students in different years of the course; to investigate the relationship of Mantoux reaction, previous BCG vaccination or with previous TB; to assess the capacity of the Mantoux test to detect recent infection with MTB, and to contribute to a better implementation of infection control measures for TB, thus reducing the risk of TB infection.

**Methods:** Some 400 medical students from the 1<sup>st</sup> and from the 5<sup>th</sup> year will be recruited. The Mantoux test will be carried out (intradermally administration of tuberculin in the forearm) and a questionnaire will be completed, including demographic data, type and duration of training periods, possible contact with TB patients, BCG vaccination, as well as past medical history of TB and factors that could influence the Mantoux results (diabetes, steroid treatment, etc.) The Mantoux (diameter of the induration in the area where the tuberculin was administered) will be read after 48 hours.

**Expected results:** It is expected to find a higher number of positive Mantoux reactions in 5<sup>th</sup> year students when compared to 1<sup>st</sup> year students. Although this is not a longitudinal study, a statistically significant difference may mean that the cause for this result is nosocomial transmission. It is hoped that the results of this study may help to improve the control of TB transmission in the Hospital Santa Maria. Furthermore, and as there are few studies on the prevalence of latent *M. tuberculosis* infection, the results of this study may contribute to a better understanding of the national situation. This aspect is even more important at a time when plans are discussed to introduce chemoprophylaxis for latent TB infection in certain risk groups.

Due to a delayed ethical approval , this study will only start in October 2005.



Alunos: Gonçalves C, Nogueira M, Santos F

Tutores: Gonçalves Ferreira AJ.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Anatomia

Telefone: 217906675 Fax: 217971756 E-mail: ajgonfer@fm.ul.pt

Título: Estudo Comparado Anatomia/IRM do Volume do Corpo Amigdalino Humano

Palavras-Chave: amígdala, neuroanatomia, IRM

**Fundamentos:** Diversos estudos de Imagiologia por Ressonância Magnética (IRM) têm sido publicados, nos últimos anos, referentes ao volume do corpo amigdalino humano (amígdala) em doentes com doença de Alzheimer, epilepsia do lobo temporal medial, entre outras. Contudo, nenhum estudo procedeu à validação anatómica directa desses achados, não se tendo avaliado o volume e respectiva variabilidade da amígdala pelo método anátomo-histológico e por IRM, nos mesmos casos.

**Objectivos:** Estudo comparativo anatomia /IRM do corpo amigdalino humano normal, com análise de variabilidade inter-hemisférica, entre sexos e ao longo da idade.

**Métodos:** O material de estudo consistiu em 20 amígdalas de 10 cérebros, obtidos por autopsia, nas primeiras 48 horas após a morte de indivíduos adultos normais, sem alterações neurológicas ou psiquiátricas conhecidas. As 20 amígdalas foram fixadas em formol a 10%, durante um mês, e, seguidamente, em formol e sacarose mais uma semana. Posteriormente, foram incluídas em OCT e congeladas em azoto líquido. Depois, foram executados cortes isotópicos seriados no criomicrotomo, de 0,5 mm em 0,5 mm, com orientação coronal. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina e Klüwer-Barrera e seleccionados para processamento informático, que consistiu em digitalização e delimitação dos respectivos contornos. Foram, ulteriormente, calculadas automaticamente as áreas de cada corte, através de um programa informático adequado, tendo sido determinado o volume amigdalino, utilizando a fórmula: Volume = Área Média x Comprimento Total. Em 6 amígdalas, foi realizada a análise comparada das imagens anatómicas e de IRM.

**Resultados:** O volume amigdalino foi calculado, pelo método anatómico, em 19 exemplares e o seu resultado (média  $\pm$  desvio-padrão) foi de 1486,6 ( $\pm$  349,9) mm<sup>3</sup>. O volume amigdalino, pelo método de IRM, foi medido em 8 exemplares e o respectivo resultado foi: 1714,1 ( $\pm$  336,8) mm<sup>3</sup>. Em 6 exemplares, foi possível fazer o estudo comparativo anatomia/IRM, tendo-se obtido os respectivos valores: 1618,4 ( $\pm$  226,3) mm<sup>3</sup> e 1608,8 ( $\pm$  313,6) mm<sup>3</sup>. Do estudo da variabilidade inter-hemisférica e ao longo da idade, pelo método anatómico, obtiveram-se os seguintes resultados: o volume da amígdala direita foi de 1400,31 ( $\pm$  317,30) mm<sup>3</sup> e o da esquerda foi de 1522,11 ( $\pm$  382,42) mm<sup>3</sup>; os valores nas idades mais avançadas foram inferiores em relação a idades menores. Não foi possível obter qualquer resultado relativo ao sexo feminino.

**Discussão/Conclusões:** Nos casos de estudo comparativo, o volume amigdalino determinado pelo método anatómico foi superior e com um desvio-padrão menor ao do método imagiológico, logo, o primeiro apresenta uma maior precisão. Verificou-se que o volume da amígdala esquerda é ligeiramente superior ao da direita. Observou-se um ténue decréscimo no volume amigdalino, ao longo dos anos de vida. Todavia, os resultados obtidos não foram estatisticamente significativos.

**Nota:** Este trabalho contou com a participação do Dr. Jorge Cannas, responsável pelo Estudo de Ressonância Magnética, no CRM de Caselas.

**Students:** Gonçalves C, Nogueira M, Santos F.

**Tutors:** Gonçalves Ferreira AJ.

**Laboratory, Centre, Unit:** Instituto de Anatomia

**Phone:** 217906675

**Fax:** 217971756

**E-mail:** ajgonfer@fm.ul.pt

---

**Title:** MRI/Anatomy Comparative study of the human amygdaloid body's volume

---

**Key-words:** amygdala, neuroanatomy, MRI

---

**Background:** In the last years, several Magnetic Resonance Imaging (MRI) volumetric studies have been published about the amygdaloid body, in patients with Alzheimer's disease and medial temporal lobe epilepsy, among others. However, these findings have not been validated by any anatomic/histological study and by MRI, in the same cases, nor the volume of the normal amygdaloid body.

**Objectives:** The objectives of this study were: 1) to compare the normal volume of the amygdaloid body obtained by the anatomic/histological method and by MRI; 2) to analyze the interhemispheric differences, age and sex variations.

**Methods:** 20 amygdaloid bodies were obtained from the autopsies of 10 normal individuals with no neurological or psychiatric disorders, made within the first 48 h after their death, from the Instituto de Medicina Legal de Lisboa. These were fixed in formol 10% for one month and formol plus sucrose for one week, after which they were embedded in OCT and frozen with liquid N<sub>2</sub>. After that, isotopic paracoronal sections of 0,5 mm were made using a freezing microtome. For the staining the haematoxylin-eosin and Klüwer-Barrera dyes were used. The histological sections were digitalized and processed by computer. The amygdaloid area was determined on each section using a special software and the volume obtained applying the function: Volume=Average area x total length. In 6 amygdalas, the anatomical and MRI data were compared.

**Results:** The amygdaloid volume has been calculated, using the anatomic method, in 19 amygdalas and the result was (mean  $\pm$  standard deviation): 1486,6 ( $\pm$  349,9) mm<sup>3</sup>. The volume was also determined by MRI in 8 amygdalas and the result obtained was: 1714,1 ( $\pm$  336,8) mm<sup>3</sup>. In 6 amygdaloid bodies, it was possible to make a comparative study anatomy/MRI and the respective values were: 1618,4 ( $\pm$  226,3) mm<sup>3</sup> and 1608,8 ( $\pm$  313,6) mm<sup>3</sup>. Concerning the inter-hemispheric and age variability, by the anatomic method, the results obtained were: right amygdaloid volume of 1400,31 ( $\pm$  317,30) mm<sup>3</sup> and left amygdaloid body of 1522,11( $\pm$  382,42) mm<sup>3</sup>; the values in older ages were inferior comparing with younger ages. It was not possible to obtain any result related to the feminine gender.

**Conclusions:** In the comparative study cases, the amygdaloid body, determined by the anatomic method, was superior and presented an inferior standard deviation, comparing with MRI, so, the first method has a better precision. The left amygdaloid volume was slightly bigger than the right amygdaloid volume. Besides that, there was a soft declination in the amygdaloid volume with the years. Although, the results obtained were not statistically significant.

**Note:** In this work, we counted with the collaboration of Dr. Jorge Cannas, responsible for the MRI study, in CRM, Caselas.

Alunos: Carvalho Afonso M, Pinto JM, Regala J, Santos P.

Tutores: Fernandes P, Gonçalves Ferreira AJ.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Anatomia

Telefone: 217906675 Fax: 217971756 E-mail: ajgonfer@fm.ul.pt

Título: Distribuição dos receptores  $\beta_2$  adrenérgicos no Locus Ceruleus Humano

Palavras-Chave:

**Fundamentos e Objectivos:**

Nos últimos anos, no Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina de Lisboa procedeu-se ao estudo da localização tridimensional (3D) precisa – anatomia estereotáxica – do Locus Ceruleus Humano (LC) e da sua variabilidade, visto ser uma estrutura não visualizável através de imagiologia por ressonância magnética (IRM). Demonstrou-se que o LC é um núcleo localizado em posição sub-ependimária na metade superior da porção protuberancial do pavimento do IV ventrículo, com uma configuração cilíndrica e disposição ligeiramente divergente no sentido caudal; as suas dimensões são aproximadamente de 14mm de comprimento e 2mm de espessura.

Uma vez que o LC é um núcleo interveniente em numerosos circuitos neuronais e são-lhe referidas aferências noradrenérgicas e dopaminérgicas, o presente projecto tem como objectivo estudar a distribuição dos receptores noradrenérgicos do LC e analisar a variabilidade espacial da distribuição desses receptores

**Material e Método:**

Material- Vinte LC obtidos de 10 TC humanos adultos normais, sem antecedentes de doença neurológica, colhidos por autópsia 48 horas *post mortem* e provenientes do Instituto de Medicina Legal de Lisboa. Método Anatómico- fixação, dissecação, inclusão e congelação dos TC; execução de cortes seriados e referenciados no micrótomo de congelação perpendicularmente ao pavimento do IV ventrículo e à linha média; coloração dos cortes com hematoxilina-eosina; marcação imunocitoquímica com anticorpo para os receptores  $\beta_2$  da norepinefrina (ADRB2). Método Informático- digitalização das imagens do LC marcados em cada nível de corte e referênciação 2-D; análise comparada das imagens obtidas por coloração histoquímica e imunocitoquímica; elaboração de mapa 2D e 3D da distribuição dos receptores marcados nos caos estudados.

**Resultados e Conclusões:**

Os resultados deste trabalho foram afectados negativamente por três importantes factores, por ordem cronológica, respectivamente: 1) impossibilidade de obtenção de encéfalos por obras no IML- Delegação de Lisboa, até Março de 2005; 2) avaria no criomicrotomo entre Março e Abril de 2005; 3) inadequação do conjunto anticorpo/marcador seleccionado à técnica em curso (a marcação resultante confundia-se com a melanina do LC). Por isso só a partir de Junho foi possível aferir o conjunto da técnica histológica. Assim, apenas 6 LC de 3 troncos cerebrais foram extensivamente estudados, nos quais se conseguiu aplicar o método anatómico por inteiro. Isto significa que não se atingiram os objectivos inicialmente traçados, mas que se tornou viável a prossecução deste projecto no futuro.

*Students:* Carvalho Afonso M, Pinto JM, Regala J, Santos P.

*Tutors:* Fernandes P, Gonçalves Ferreira AJ.

*Laboratory, Centre, Unit:* Instituto de Anatomia

*Phone:* 217906675

*Fax:* 217971756

*E-mail:* ajgonfer@fm.ul.pt

---

*Title:* The  $\beta_2$ -adrenergic labeling of the Human Locus Ceruleus

---

*Key-words:*

---

**Background and Objectives:**

The human Locus Ceruleus (LC) has been studied in the last year in this Institute in the scope of a FML-GAPIC project. The objective of the study was the 3-D localization of the nucleus because it cannot be directly visualised "in vivo" by Magnetic Resonance Imaging (MRI).

As the LC is an intervenient nucleus in a several neuronal pathways such as noradrenergic and dopaminergics afferencies. The aim of this work is to study the distribution of the noradrenergic receptors and the analyse of the spatial variability of these receptors.

**Material and Methods:**

Material: 20 LC from 10 normal adult human brainstems, collected by routine autopsy, 48 hours after death, at the "Instituto de Medicina Legal de Lisboa".

Anatomical study: Fixation, dissection, inclusion and freezing of the brainstems; serial cutting in a cryomicrotome perpendicularly to the midsagittal and the IV ventricle floor planes; slice staining with hematoxylin-eosin; imunocitochemical labeling with antibody for the  $\beta_2$ -noradrenergic receptors(ADRB2).

Computer study: slice imaging digitizing, level by level, and 2-D referenciation; cell marking and contour tracing based on 2-D cell distribution. Study of the 3-D distribution of the cells marked with the antibody. 2-D and 3-D comparison of such distribution in relation within the LC cell population.

**Results and Conclusions:**

The project results were severely affected by three important negative factors (by chronologic order): 1) collection of brainstems was not possible, until March 2005, because of works in the "Instituto de Medicina Legal de Lisboa"; 2) cryomicrotome failure during March and April of 2005; 3) inadjustment of the antibody-marker to the histological technique in use. So, only after June was possible to fix the right histological technique. Therefore, only 6 LC from 3 brainstems were studied, with the entire technique. This meant that the goals of the project weren't achieved, but it was possible to standardize the technique for further research.

Alunos: Bia AC.

Tutores: Martins e Silva J.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Biopatologia Química

Telefone: 217985136 Fax: 217939791 E-mail: anagbia@gmail.com

Título: Influência do ditiotreitól no mecanismo de transdução de sinal do NO, mediado pela banda 3

Palavras-Chave: Peroxinitrito; ditiotreitól; proteína banda 3

**Fundamento:** O monóxido de azoto (NO) libertado pelas células endoteliais, reage, na fase aquosa do plasma, com o anião superóxido ( $O_2^-$ ) para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que entra no eritrócito através do canal iónico da banda 3. A porção N-terminal desta proteína constitui um local de ligação de várias enzimas glicolíticas, como a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPD).

*In vitro*, é possível simular a presença de NO no meio extracelular recorrendo a dadores específicos, entre os quais a esperminaNONOate.

No interior da célula, o peroxinitrito pode levar à formação de grupos –SNO que, ao ligarem-se aos resíduos de cisteína do centro activo da enzima GAPD, diminuem a afinidade da enzima pela banda 3, ocorrendo a sua translocação para o citoplasma. Esta forma livre pode ser nitrosilada (forma transitoriamente inactiva) ou reduzida pelo glutatião (GSH) (catalíticamente activa).

Por outro lado, sabe-se que o peroxinitrito altera o estado redox intracelular, oxidando o glutatião reduzido e os resíduos de cisteína das proteínas, diminuindo assim as defesas anti-oxidantes das células.

O ditiotreitól (DTT), um agente tio-redutor, pode contribuir para a manutenção da concentração de GSH, aumentando as defesas anti-oxidantes da célula. Desta forma, o DTT contraria a acção inibitória do peroxinitrito sobre a forma livre da enzima.

**Objectivo:** Pretende-se estudar de que modo o DTT influencia, na presença de concentração de NO igual a  $10^{-5}M$ , a via de transdução de sinal tirosina-dependente da proteína banda 3, em eritrócitos humanos.

**Modelo experimental:** O sangue foi dividido em 7 alíquotas de 1ml. As primeiras 6 alíquotas foram incubadas, respectivamente, com: DTT  $10^{-6}M$ , DTT  $10^{-5}M$ , DTT  $10^{-4}M$ , DTT  $10^{-6}M$  + esperminaNONOate  $10^{-5}M$ , DTT  $10^{-5}M$  + esperminaNONOate  $10^{-5}M$  e DTT  $10^{-4}M$  + esperminaNONOate  $10^{-5}M$ . A alíquota restante serviu de controlo.

**Métodos:** Determinaram-se as concentrações de peroxinitrito por espectrofluorimetria e de GSH por espectroscopia.

**Resultados:** Na alíquota incubada com DTT  $10^{-5}M$ , verifica-se um aumento da concentração basal de GSH (31,7%) e uma diminuição acentuada da concentração de peroxinitrito (83,4%). Na presença de DTT  $10^{-5}M$  e esperminaNONOate  $10^{-5}M$  verifica-se igualmente aumento da concentração basal de GSH (76,3%) e um aumento da concentração de peroxinitrito (28,1%).

**Conclusões:** A concentração óptima de DTT igual a  $10^{-5}M$  permite manter um ambiente intracelular anti-oxidante, porque há elevação da concentração basal de GSH e diminuição da concentração basal de peroxinitrito, na presença de NO.

Students: Bia AC.

Tutors: Martins e Silva J.

Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Biopatologia Química

Phone: 217985136

Fax: 217939791

E-mail: anagbia@gmail.com

---

Title: Dithiothreitol influence on NO signal transduction pathway, mediated by protein band 3

---

Key-words: Peroxynitrite; dithiothreitol; protein band 3

---

**Background:** Nitric oxide (NO), released by vascular endothelial cells, reacts in the aqueous phase of plasma with superoxide anion to form peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), which enters RBCs through protein band 3. The N-terminal portion of this protein is also a binding site for various glycolytic enzymes, such as Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD).

It is possible to simulate *in vitro* the presence of extracellular NO by using specific NO donors, such as SpermineNONOate.

Inside the cell, peroxynitrite may form –SNO groups that bind to cysteine residues of GAPD catalytic centre. This reverses band 3 binding and allows GAPD translocation to the cytoplasm. The free form of GAPD may be nitrosylated (transiently inactive form) or reduced by glutathione (GSH) (catalytically active).

On the other hand, peroxynitrite alters the intracellular redox state, oxidizes GSH and cysteine residues, lowering the anti-oxidant defences of cells.

Dithiothreitol (DTT), a thio-reducer agent, may increase GSH concentration and cell's anti-oxidant defences. DTT opposes the peroxynitrite inhibitory action on the enzyme free form.

**Objectives:** The purpose of this work was to study how DTT influences the tyrosine-dependent signal transduction pathway on human erythrocytes, in the presence of NO 10<sup>-5</sup>M.

**Experimental model:** Whole blood sample was divided in seven aliquots. The first 6 aliquots were incubated respectively with: DTT 10<sup>-6</sup>M, DTT 10<sup>-5</sup>M, DTT 10<sup>-4</sup>M, DTT 10<sup>-6</sup>M + spermineNONOate 10<sup>-5</sup>M, DTT 10<sup>-5</sup>M + spermineNONOate 10<sup>-5</sup>M e DTT 10<sup>-4</sup>M + spermineNONOate 10<sup>-5</sup>M. The remaining aliquot was considered as the control.

**Methods:** We determined peroxynitrite concentration by spectrofluorimetry method and GSH concentration by spectroscopy method.

**Results:** In presence of DTT 10<sup>-5</sup>M GSH basal concentration increased (31,7%) and peroxynitrite concentration decreased markedly (83,4%). In presence of DTT 10<sup>-5</sup>M and spermineNONOate 10<sup>-5</sup>M GSH basal concentration increased (76,3%) and peroxynitrite concentration increased (28,1%).

**Conclusions:** DTT optimal concentration of 10<sup>-5</sup>M allows an intracellular anti-oxidant environment, namely increasing GSH basal concentration and decreasing peroxynitrite basal concentration, in presence of NO.

Alunos: Carrilho BM.

Tutores: Saldanha C, Martin Martins J.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Biopatologia Química

Telefone: 217985136 Fax: 217999477 E-mail: [brunocarrilho@hotmail.com](mailto:brunocarrilho@hotmail.com)

Título: Alterações hemorreológicas na Diabetes Mellitus - importância do controlo metabólico

Palavras-Chave: Diabetes Mellitus, Hemorreologia, Insulina.

**Fundamento:** A Diabetes Mellitus (DM) é considerada como um problema prioritário de Saúde Pública e tem sido definida como a epidemia do século XXI. A extrema importância desta situação resulta fundamentalmente de uma elevada morbidade e mortalidade precoce, dependentes das complicações micro e macrovasculares da doença. Estas lesões advêm da formação de trombos na microcirculação que têm como causa directa algumas alterações hemorreológicas, tais como o aumento da agregação eritrócitária, da viscosidade plasmática, a diminuição da deformabilidade dos eritrócitos, etc. Actualmente emerge um consenso que considera o estado hiperglicémico como elemento fundamental, entre outros, na alteração hemorreológica responsável pela patogénese das complicações vasculares da DM. O modelo emergente aponta o controlo metabólico como a chave para a estabilização das lesões micro e macrovasculares. Este modelo ganha crescente credibilidade pela eficácia de medidas terapêuticas tão diversas como os hipoglicemiantes, hipolipemiantes, anti-hipertensores e anti-oxidantes.

**Objectivos:** Com este estudo pretende-se inferir qual a relação entre a hiperglicémia na DM e as alterações hemorreológicas que originam as ulteriores lesões micro e macrovasculares. Averiguar-se-á igualmente se o controlo da glicémia, com insulina, minimiza essas mesmas alterações hemorreológicas. Este estudo permitirá também inferir qual dos dois modelos experimentais de DM utilizados é mais eficaz e compensador no estudo da doença.

**Métodos:** O protocolo experimental foi realizado em porcos domésticos (*Sus scrofa domestica*), com 3-4 meses de idade, a que corresponde um peso médio de 20kg. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade e divididos aleatoriamente em 3 grupos: o grupo 1 (n=6) – **controlo**; grupo 2 (n=9) e 3 (n=9) – **Diabetes Mellitus**. A DM foi induzida nos animais do grupo 2 pela administração endovenosa de Aloxano (SIGMA A7413) na dose única de 0,1g/kg. Os animais do grupo 3 tornaram-se diabéticos através da administração endovenosa da Estreptozotocina (SIGMA S0130), na dose única diária de 50mg/kg de peso durante 3 dias. Durante todo o protocolo experimental procedeu-se à colheita de 12,5mL de sangue venoso de cada animal para posterior determinação laboratorial de importantes parâmetros hemorreológicos: Viscosidade plasmática, Deformabilidade Eritrocitária, Agregação eritrocitária, concentração de fibrinogénio, etc. A normalização de glicémias superiores a 200 g/dL foi realizada pela administração subcutânea de insulina lenta na dose de 0,6U/kg, com as devidas adaptações.

**Resultados e Conclusões:** Os resultados até agora obtidos revelam que existe tendencialmente uma relação positiva entre a hiperglicémia na DM e as alterações pré-patológicas dos parâmetros hemorreológicos estudados. Contudo, só o estudo estatístico final, mostrado na apresentação, revela os valores estatisticamente significativos.

*Students:* Carrilho BM.

*Tutors:* Saldanha C, Martin Martins J.

*Laboratory, Centre, Unit:* Instituto de Biopatologia Química

*Phone:* 217985136

*Fax:* 217999477

*E-mail:* [brunocarrilho@hotmail.com](mailto:brunocarrilho@hotmail.com)

---

*Title:* Haemorheologic alterations in Diabetes Mellitus - importance of the metabolic control.

---

*Key-words:* Diabetes Mellitus, Haemorheology, Insulin

---

**Background:** Diabetes Mellitus (DM) is considered a major public health problem and has been called the epidemic of the XXI century.

The extreme importance of this disease comes from its high morbidity and early mortality that depends of micro and macrovascular problems. These lesions derive from the formation of thrombi on the microcirculation, which have as direct cause some haemorheological alterations such as the raise of eritrocitary aggregation and plasmatic viscosity, diminished eritrocitary deformability, etc.

Currently, a consensus emerges that considers the hyperglycaemic state as the key element, among others, in the haemorheological alteration responsible in the pathogenesis of the vascular complications that occur in DM.

The emerging model focuses on the metabolic control as the answer to stabilize the micro and macrovascular lesions. This model has been acquiring crescent credibility thanks to the efficiency of therapeutic measures so diverse such as hypoglycaemics, hypolipidaemics, antihypertensive therapy and anti-oxidants.

**Objectives:** With this study we intended to find the relation between the hyperglycaemia of DM and the haemorheological alterations that originate the subsequent micro and macrovascular lesions. We also explored if the glycaemia control with insulin is able to minimize these vascular lesions. This study will also be able to surmise which of the two DM experimental models is more effective and compensatory for the study of this disease.

**Methods:** The experimental protocol was done in domestic pigs (*Sus scrofa domestica*), with 3-4 months old, which is equivalent to a weight of 20Kg. The animals were kept in the Faculty's biotery and randomly divided in 3 groups: group 1 (n=6) – **control**; group 2 (n=9) and 3 (n=9) – **Diabetes Mellitus**. The DM was induced in the animals of group 2 by endovenous administration of Aloxan (SIGMA A7413) in the single dose of 0.1g/Kg. The animals of group 3 were made diabetic by the endovenous administration of Streptozotocin (SIGMA S0130) in the single daily dose of 50mg/kg for 3 days. Through all the experimental protocol the taking of 12.5ml of venous blood from each animal was made for following laboratorial determination of important haemorheological parameters: plasmatic viscosity, eritrocitary deformability, eritrocitary aggregation, fibrinogen concentration, etc. The normalization of glycaemias higher than 200g/dl was obtained by the subcutaneous administration of slow insulin in the dose of 0.6U/Kg, with the appropriate adaptations.

**Results and Conclusions:** The results obtained till now reveal that there is a tendency towards a positive relation between hyperglycaemia in DM and the pre-pathological alterations of the studied haemorheological parameters. However, only the final statistic study, which will be shown in the presentation, shall reveal the meaningfully statistic data.



Alunos: Pinto L.

Tutores: Luz-Rodrigues H.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Farmacologia e Neurociências

Telefone:

Fax:

E-mail:

Título: Estudo dos Mediadores contrácteis dependentes da COX-1 e da COX-2 na actividade do NO no rim isolado perfundido do rato

Palavras-Chave: Ciclooxygenase; monóxido de azoto; receptor do tromboxano

**Fundamentos:** A estimulação adrenérgica induz a ciclooxigenase (COX) a produzir várias substâncias vasoactivas comuns a outras vias reguladoras do tónus vascular, entre as quais metabolitos derivados do ácido araquidónico (AA) e espécies reactivas de oxigénio (ERO). A acção globalmente vasoconstritora destas substâncias resulta de um complexo grupo de interacções, ainda pouco conhecidas, entre várias vias vasomoduladoras. Neste campo, alguns Autores sugerem que a acção vasoactiva das ERO estará dependente da actividade da COX; outros, apontam para uma modulação de várias vias, nomeadamente do monóxido de azoto (NO), por parte de receptores dos metabolitos vasoconstritores derivados do AA.

**Objectivos:** 1. Esclarecer a importância das ERO e dos agonistas do receptor do  $TXA_2$  (TP-R) na resposta constritora dependente da COX; 2. Determinar a relevância da actividade da COX no efeito vasoactivo global das ERO e dos ligandos do TP-R; 3. Caracterizar as contribuições relativas das isoformas da COX nos dois pontos anteriores; 4. Contribuir para esclarecer a interacção existente entre o TP-R e o NO.

**Métodos:** Foram isolados e perfundidos o rim direito de ratos Wistar com solução Tyrode a fluxo constante de 5mL/min, a 37°C, oxigenado com 95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>. Obteve-se curvas dose-resposta de fenilefrina(PHE), incluindo no meio de perfusão: um scavenger de ERO (Superoxido dismutase; SOD; 150U/mL), inibidores da COX (não selectivo: indometacina 5.6uM; COX-1: SC-560 90nM; COX-2: NS-398 1uM), um antagonista do TP-R (SQ-29,548 1uM), um inibidor da sintase do NO (NOS; L-NOARG 10uM). Os parâmetros obtidos foram calculados por regressão não-linear (GraphPad PRISM) e comparados através do t-student.

**Resultados:** O scavenger de ERO e o antagonista do TP-R reduziram o Emax dos controlos, não tendo a adição dos inibidores da COX induzido alterações. Isoladamente os inibidores não selectivo e da COX-1 provocaram uma diminuição do Emax registado; o inibidor da COX-2 não alterou os registos. A adição do scavenger de ERO e do antagonista do TP-R conduziu a um decréscimo apenas no meio contendo o inibidor selectivo da COX-2. O inibidor da NOS não induziu alterações na presença do antagonista do TP-R. Quando a NOS foi inibida, a redução induzida pelo antagonista do TP-R deixou de ser significativa.

**Conclusões:** 1. A resposta vasoconstritora dependente da COX à estimulação com PHE no modelo do rim isolado de rato depende quer da presença de ERO, quer a activação do TP-R. 2. A acção vasoconstritora das ERO e do TP-R parecem estar dependentes da actividade da COX. 3. Ambos os processos parecem relacionados com a isoforma COX-1. 4. O NO parece estar envolvido na acção globalmente vasoconstritora do TP-R. O modo pela qual esta interacção ocorre não é ainda conhecida.

Students: Pinto L.

Tutors: Luz-Rodrigues H.

Laboratory, Centre, Unit: Institute of Pharmacology and Neuroscience

Phone: Fax: E-mail:

---

Title: COX-1 and COX-2 dependent contractile mediators in NO activity in the isolated perfused rat kidney

---

Key-words: Cyclooxygenase; Reactive oxygen species; thromboxane A<sub>2</sub> receptor

---

**Background:** Adrenergic stimulation induces Cyclooxygenase (COX) to produce a number of vasoactive substances common to several modulating pathways, namely araquidonic-acid (AA) derived metabolites and reactive oxygen species (ROS), globally producing a vasoconstrictor response. The relative contribution of these substances to that response and the mechanisms through which they act is hitherto undetermined. Several theories assert an interaction involving ROS vasoactive properties with COX-derived metabolites, while some authors point a possible interaction between AA-derived contractile metabolites, such as thromboxane A<sub>2</sub> or isoprostane, receptors (TP-R) response and nitric oxide (NO).

**Objectives:** 1. Assess the importance of ROS and TP-R in the COX-dependent vasoactive response 2. Determine the impact of COX activity in the vascular modulating action of both ROS and TP-R. 3. Characterize the significance of each COX isoform in the two previous points. 4. Contribute to clarify the existing interactions between TP-R and NO.

**Methods:** Right kidneys from Wistar rats were isolated and perfused with a tyrode's solution at a constant flow of 5mL/min, at 37°C, oxygenated with 95%O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>. Phenylephrine(PHE) dose-response curves were obtained with: a ROS scavenger (Superoxide Dismutase; 150U/mL); different COX-inhibitors (non-selective: indomethacin 5.6uM; COX-1: SC-560 90nM; COX-2: NS-398 1uM), a TP-R antagonist (SQ-29.548 1uM) and a NO synthase (NOS; inhibitor (L-NOARG 10uM). The dose-response curve parameters were calculated by nonlinear regression analysis (GraphPad PRISM) and compared by Student's t test.

**Results:** Both ROS scavenger and TP-R antagonist reduced Control-Emax with subsequent COX inhibitors producing no additional effect. Only non-selective and COX-1 selective inhibitors induced a decrease in registered Emax, while COX-2 produced no effect. ROS scavenging and TP-R antagonist diminished recorded parameters only in the COX-2 inhibitor containing solution. NOS inhibitor produced no net effect in neither control nor TP-R antagonist solutions. Otherwise addition of TP-R antagonist to the NOS inhibitor solution instead no longer significantly diminished Emax registered pressure.

**Conclusions:** 1. COX-dependent vasoconstrictor response to PHE stimulation in the isolated perfused rat kidney requires both ROS and TP-R activity. 2. ROS and TP-R vasoactive properties seem to be likewise dependent on COX activity. 3. Both the referred processes seem to be COX-1 related. 4. NO appears to be involved in TP-R globally vasoconstrictor response. The mechanisms of this interaction should be clarified in later studies.

Alunos: Silva Marques J.

Tutores: Luz Rodrigues H, Saldanha C.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Farmacologia e Neurociências, Instituto de Biopatologia Química

Telefone: 916060822 Fax: 217999454 E-mail: j.m@oninetspeed.pt

Título: Estudo da Anemia em Doentes com Insuficiência Cardíaca Crónica: Avaliação da Patogenicidade da Hormona Antidiurética

Palavras-Chave: Insuficiência Cardíaca, Anemia, Hormona Antidiurética

**Fundamento:** A presença de anemia nos doentes com Insuficiência Cardíaca Crónica (ICC) associa-se a uma maior morbilidade e mortalidade. Tem sido sugerido que a hemodiluição possa ser um importante mecanismo no aparecimento desta anemia. Embora seja reconhecido o papel da Hormona Antidiurética (HAD) na regulação da volémia e na fisiopatologia da ICC, a sua relação com a anemia não está esclarecida. A insuficiência renal crónica e a consequente redução de eritropoietina (EPO) também têm sido propostas como factores responsáveis pela anemia na ICC. Todavia, estes doentes parecem apresentar níveis elevados de EPO e, paradoxalmente, a administração de rHu-EPO em pequenos ensaios mostrou evidência de benefício clínico. Estes diferentes factores presentes na anemia na ICC podem induzir alterações hemorreológicas que podem contribuir para um maior risco cardiovascular.

**Objectivos:** Avaliar a correlação dos níveis séricos da Hormona Antidiurética e da Eritropoietina com a anemia em doentes com ICC.

Avaliar a eventual correlação entre a anemia e perfis de alto risco de parâmetros hemorreológicos.

**Métodos:** Estudo transversal comparativo em que foram incluídos 26 doentes com o diagnóstico de ICC descompensada, internados no Hospital de Santa Maria. Compararam-se 2 grupos: Com Anemia (n=15) e Sem Anemia (n=11). No primeiro dia de internamento colheu-se sangue para doseamento plasmático de HAD, EPO e determinação de hemograma com parâmetros eritrocitários, fibrinogénio, viscosidade plasmática, agregação eritrocitária, deformabilidade eritrocitária e fluidez da membrana eritrocitária. Dos processos clínicos recolheu-se informação demográfica, clínica e laboratorial.

**Resultados:** O grupo de doentes com ICC e Anemia apresentou concentrações de HAD significativamente superiores ao grupo Sem Anemia ( $954,6 \pm 59,2$  pg/l;  $767,8 \pm 64,0$  pg/l;  $p=0,04$ ). Observámos uma correlação inversa entre o défice de hemoglobina e a concentração de HAD ( $r^2=0,20$ ;  $p=0,02$ ). Registou-se uma tendência para os doentes com anemia apresentarem concentrações de EPO inferiores ( $p=0,09$ ). A concentração de EPO não se relacionou com a creatininémia. Os parâmetros hemorreológicos avaliados não apresentaram diferenças significativas nos grupos estudados. O tempo de internamento e mortalidade intra-hospitalar não foram diferentes nos doentes com e sem anemia.

**Conclusões:** 1. Na insuficiência cardíaca descompensada, a HAD está mais elevada nos doentes com anemia. A correlação da [HAD] com o grau de anemia sugere que esta hormona intervém na fisiopatologia da anemia da ICC.

2. Para os níveis de disfunção renal avaliados, a ausência de redução significativa de EPO nos doentes com anemia sugere que esta possa não ser um factor determinante no desenvolvimento dessa anemia.

3. Os parâmetros hemorreológicos não parecem ser influenciados pela presença de anemia.

Students: Silva Marques J.

Tutors: Luz Rodrigues H, Saldanha C.

Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Farmacologia e Neurociências, Instituto de Biopatologia Química

Phone: 916060822

Fax: 217999454

E-mail: j.m@oninetspeed.pt

---

Title: Anemia in chronic heart failure patients study: evaluation of the antidiuretic hormone pathogenic role

---

Key-words: Heart Failure, Anemia, Antidiuretic Hormone

---

**Background:** Anemia in Chronic Heart Failure (CHF) patients has been associated to an increased morbidity and mortality. Hemodilution has been pointed out as a major pathologic mechanism to that anemia. The role of Antidiuretic Hormone (ADH) as an intervening factor in the pathogenesis of CHF and its role in plasma volume regulation are well known, but its relation to anemia is not known. Chronic renal failure and the resulting decrease in erythropoietin (EPO) production have been regarded as possible mechanisms responsible for anemia in CHF. Nonetheless, these patients have higher levels of circulating EPO and paradoxically, rHu-EPO administration in small trials has shown clinical benefit. These factors which are present in anemia related to CHF may induce hemorrheologic changes that may lead to an increased cardiovascular risk.

**Objectives:** To evaluate the relation of anemia with plasma levels of ADH and EPO, in in-hospital decompensated CHF patients.

To assess a possible relationship between anemia and high risk hemorrheologic profiles.

**Methods:** Transversal comparative study in which 26 patients with the diagnosis of decompensated CHF admitted to the Hospital de Santa Maria have been included. Two groups were compared: With Anemia (n=15) and Without Anemia (n=11). Blood was collected in the first day of internment to measure plasmatic levels of ADH, EPO and to determine blood count and red cell indices, fibrinogen, blood viscosity, erythrocyte aggregation, erythrocyte deformability and erythrocyte membrane fluidity. Demographic, clinical and laboratorial data were taken from the patient files.

**Results:** The CHF and anemia group had significantly higher plasma levels of ADH than the group without anemia ( $954.6 \pm 59.2 \text{ pg/l}$ ;  $767.8 \pm 64.0 \text{ pg/l}$ ;  $p=0.04$ ). We found an inverse relation between the hemoglobin deficit and the ADH plasma levels ( $r^2=0.20$ ;  $p=0.02$ ). There was a trend towards lower EPO levels in the anemia group ( $p=0.09$ ). EPO concentration did not relate to creatinine plasma levels. The hemorrheologic parameters didn't show any significant difference between the two groups. Time to discharge from hospital and intrahospital mortality were not different between patients with and without anemia.

**Conclusions:** 1. In CHF, ADH levels are higher in patients with anemia than without anemia. The correlation of [ADH] to anemia severity suggests that this hormone may play a role in the pathophysiology of anemia in CHF.

2. For the levels of renal dysfunction evaluated, the absence of significant EPO reduction in anemia patients suggests that this hormone may not be a critical factor in the way to this particular type of anemia.

3. Hemorrheologic parameters do not seem to be influenced by anemia.

Alunos: Laranjo SM.

Tutores: Rocha I.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Fisiologia

Telefone: 47105 Fax: E-mail: sergiolaranjo@fm.ul.pt

Título: Estudo da variabilidade da pressão vesical

Palavras-Chave: Wavelets, Sistema Nervoso Autónomo, função da bexiga

A compreensão do Sistema Nervoso Autónomo, das suas funções e papel dos seus componentes é essencial para a compreensão das suas disfunções, ou disautonomias. Num doente com suspeita de disautonomia é importante determinar se a função autonómica é normal ou anormal; se anormal, qual o grau de disfunção e se é primária ou secundária à doença. A avaliação da função autonómica depende de arcos reflexos, actividade de nervos eferentes e resposta do órgão terminal. A informação dada por cada teste autonómico não deve se tida como absoluta. Esta informação é necessária não apenas para o diagnóstico mas também para avaliar a terapêutica e os seus benefícios. Existem vários métodos laboratoriais usados para investigar a função autonómica, em particular a função cardiovascular, uma vez que a pressão arterial e a frequência cardíaca são facilmente registradas, de forma contínua e não invasiva. Um grupo de testes inclui o uso de algoritmos matemáticos no domínio do tempo e da frequência. O método mais usado no domínio da frequência é a Transformada Rápida de Fourier (FFT) que calcula um espectro de potência das frequências presentes no tacograma da variável analisada. Deste espectro podem ser caracterizadas três bandas: very low frequencies (VLF), low frequencies (LF) e high frequencies (HF). Para LF e HF foi estabelecido um significado funcional: as LF são um marcador da actividade simpática, enquanto que as HF, correlacionadas com a frequência respiratória, reproduzem a actividade parassimpática. No entanto, o uso de FFT tem as suas limitações uma vez que o sinal a ser analisado tem de ser estacionário e de longa duração (>5 min) o que torna a avaliação da actividade autonómica em fenómenos de adaptação rápida não reproduzível e impossível de analisar. Em trabalhos prévios, mostrámos que a transformada de wavelet, aplicada no domínio tempo-frequência na análise de parâmetros cardiovasculares, é uma metodologia apropriada para a avaliação de adaptações autonómicas súbitas. O propósito deste trabalho é o de aplicar FFT e transformada de Wavelet na análise da influência autonómica na função vesical do rato anestesiado. Os ratos (n=6) foram anestesiados (pentobarbital de sódio, 40mg/kg); traqueostomizados; a artéria e veia femurais foram cateterizadas para registo da pressão arterial e injeção de soro e drogas, respectivamente. A pressão vesical foi registrada através de um catéter urinário; o ECG foi monitorizado. Os registos foram realizados a diferentes frequências respiratórias e com a bexiga em dois estados: vazia e com a pressão a despoletar o reflexo da micção. No fim das experiências os animais foram sacrificados com overdose de anestésico. Os dados foram capturados usando um sistema A/D (1K) e a análise foi realizada com software desenvolvido em ambiente Origin e Matlab Wavelet toolbox. Os resultados demonstram a presença de espectros de potência na pressão vesical, correlacionáveis com o espectro da pressão arterial do mesmo animal, permitindo o cálculo do índice LF/HF. A aplicação da transformada de wavelet à pressão vesical mostrou ser um método apropriado e reproduzível para análise das influências autonómicas na pressão vesical sob estimulação externa.

*Students:* Laranjo SM.

*Tutors:* Rocha I

*Laboratory, Centre, Unit:* Instituto de Fisiologia

*Phone:* 47105    *Fax:*                    *E-mail:* sergiolaranjo@fm.ul.pt

---

*Title:* Urinary bladder pressure variability

---

*Key-words:* wavelets, autonomic nervous system; urinary bladder function

---

The understanding of the autonomic nervous system, its function and the role of its components is essential for the understanding of its dysfunctions or disautonomies. In a patient with a suspected disautonomy is important to determine if the autonomic function is normal or abnormal; and if abnormal, which is the degree of dysfunction and if the abnormality is of primary or secondary to a pathology. The assessment of autonomic function depends on the reflex arcs, efferent nerve activity and end-organ responsiveness and the information that is given by each autonomic test should never be taken as having an absolute value. However, this information is needed not only for diagnosis but also to evaluate the therapeutics and its benefits. There are several laboratory methods used to investigate autonomic function in particular cardiovascular function since blood pressure and heart rate are easily recorded, continuously and non-invasive, from patients. A group of test includes the use of mathematical algorithms in the time and in the frequency domains. The most widely method used in the frequency domain is the Fast Fourier Transform (FFT) which computes a power density spectrum of the different frequencies shown in the tachogram of analysed variable. From this spectrum a group of three bands can be characterised: very low frequencies (VLF), low frequencies (LF) and high frequencies (HF). For LF and HF a functional significance has been established: LF is a marker of sympathetic activity whilst HF being correlated with the respiratory rhythm reproduces the parasympathetic activity. However, the use of FFT has its limits since the signal to be applied on has to be stationary and of long duration (> 5 min) which makes the evaluation of autonomic function in rapid adaptive phenomena not reproducible and impossible to compute. In previous works, we showed that wavelet transform applied in the time-frequency domain to the analysis of cardiovascular parameters is a suitable methodology for the evaluation of sudden autonomic adaptations. The purpose of this work is to apply FFT and wavelet transforms to the analysis of autonomic influences on urinary bladder function of the anaesthetised rat. Rats (n=6) were anaesthetised (sodium pentobarbital, 40mg/kg); a tracheotomy was made low in the neck; femoral artery and vein were cannulated for recording of arterial blood pressure and injection of saline and drugs, respectively. Urinary bladder pressure was recorded through a urethral catheter; ECG was monitored. The recordings were made for different respiratory rhythms and for two conditions of bladder function: empty and with pressure triggering the micturition reflex. In the end of the experiments animals were killed by an overdose of anaesthetic. Data were captured using an A/D system (1K) and data analysis was made using software developed in Origin and Matlab Wavelet toolbox environment. Results show the presence of a power density spectrum on urinary bladder pressure that correlates with the blood pressure spectrum of the same animal allowing the calculation of LF/HF index. Also, the application of wavelet transform to the urinary bladder pressure showed to be a suitable and reproducible method to evaluate autonomic influences on bladder pressure under external stimulation.

Alunos: Costa RP.

Tutores: Fleming J.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Medicina Molecular / Unidade de Biologia Celular

Telefone: 217999519 Fax: 217999504 E-mail: jfleming@fm.ul.pt

Título: Caracterizar a degradação da forma wild-type e de formas causadoras de amiloidose da lisosima humana.

Palavras-Chave: Degradação Associada ao Retículo Endoplásmico (ERAD); Resposta a Proteínas mal Enroladas (UPR); Enzimas Conjugadoras da Ubiquitina (Ubc); Lisosima

Estima-se que para cima de 60% das proteínas celulares formadas em mamíferos são inicialmente mal enroladas. A acumulação destas proteínas incorrectamente enroladas e por isso com uma conformação errada seria tóxica para a célula, pelo que a existência de sistemas de controlo de qualidade é essencial, fazendo com que estas proteínas sejam correctamente enroladas ou degradadas. Proteínas com uma conformação errada estão associadas a diversas condições patológicas humanas, muitas vezes ligadas a mutações genéticas que afectam a estrutura ou a conformação de proteínas reguladoras importantes. Nestes casos a patologia pode ser originada directamente pela perda de função da proteína, ou indirectamente pela acumulação e agregação das formas mutantes.

Um sistema de controlo de qualidade localizado na membrana do Retículo Endoplásmico (ER) monitoriza especificamente a conformação incorrecta das proteínas de secreção. Quando persiste o incorrecto enrolamento, o sistema de monitorização detecta-o e activa uma via de sinalização que desencadeia a Resposta a Proteínas mal Enroladas (UPR). Esta cascata de sinalização culmina na activação dos factores de transcrição ATF6 e XBP-1, que por seu turno vão mediar diversos acontecimentos da UPR. Estes incluem a expressão aumentada de proteínas *chaperone* tais como a BiP.

A ubiquitinação e a degradação proteossómica das proteínas mal enroladas faz também parte da UPR, processo esse que toma a designação de Degradação Associada ao Retículo Endoplásmico (ERAD). Este processo envolve a acção coordenada das Enzimas Conjugadoras da Ubiquitina (Ubc) e das Ubiquitina Ligases (E3) localizadas no ER. Ao passo que outros grupos têm direccionado os seus esforços na regulação das E3 associadas à ERAD, nós demonstrámos recentemente que a Ubc6e é também um alvo na via de sinalização da UPR e que uma expressão aumentada de ATF6 leva a um aumento dos níveis de mRNA da Ubc6e. Isto realça um aspecto não antes descrito para a regulação da UPR em mamíferos e interessa-nos compreender o quão importante isto é na degradação das formas mutantes das proteínas implicadas no desenvolvimento de doenças humanas. Nestas incluem-se a forma mutante D67H da lisosima humana, causadora de amiloidose e associada a inúmeras amiloidoses gástricas e renais (13, 14).

Neste estudo concluímos que a lisosima mutante D67H é direccionada ao ER de células HEK293 transfectadas, onde induz uma UPR. Quando no ER é sujeita a ubiquitinação e degradação proteossómica. Para demonstrar o envolvimento da Ubc6e neste processo co-transfectamos células HEK293 com a lisosima D67H e Ubc6e. Daqui resultou uma diminuição na expressão da forma *steady state* da lisosima D67H que podia ser revertida se as células fossem co-transfectadas com a isoforma dominante negativa Ubc6eC91S. Continuam os estudos para purificar Ubc6e e E3 ligadas à ERAD para ser possível reconstituir *in vitro* a ubiquitinação da forma mutante D67H da lisosima.

*Students:* Costa RP.

*Tutors:* Fleming J.

*Laboratory, Centre, Unit :* Unit of Cell Biology

*Phone:* 217999519

*Fax:* 217999504

*E-mail:* jfleming@fm.ul.pt

---

*Title:* To characterize the degradation of wild type and amyloid-causing variants of human lysozyme.

---

*Key-words:* Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (ERAD); Unfolded Protein Response (UPR); Ubiquitin Conjugating Enzymes (Ubc); Lysozyme.

---

It is estimated that over 60% of mammalian cellular proteins are initially folded incorrectly. The accumulation of these proteins would be toxic to the cell so quality control systems are required to ensure that they are either refolded correctly or get degraded. Protein misfolding has also been described as a characteristic of certain human diseases, occurring, for example, as a consequence of genetic mutations that influence the structure and folding of important regulatory proteins. In such cases disease can be caused directly by loss of protein function, or indirectly as a consequence of the accumulation and aggregation of the misfolded mutant variants.

A cellular quality control system located at the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) monitors specifically for incorrectly folded secretory proteins. When persistent protein misfolding is detected ER-localized signaling pathways induce a stress response that is known as the unfolded protein response (UPR). This signaling leads to activation of the ATF6 and XBP-1 transcription factors, which in turn mediate many of the resulting UPR-related events. This includes increased expression of chaperone proteins such as BiP.

Ubiquitination and proteasomal degradation of misfolded proteins is also observed during the UPR in a process that is referred to as endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD). This involves the coordinate activities of ubiquitin conjugating enzymes (Ubc's) and ubiquitin protein ligases (E3's) that are located at the ER. While other groups have focused on regulation of ERAD E3 ligases we have recently demonstrated that the Ubc enzyme Ubc6e is a target also for UPR signaling and that over-expression of activated ATF6 leads to increased Ubc6e mRNA levels. This points to a tier of regulation not previously described for the mammalian UPR and we are interested in understanding how important this is in the degradation of mutant proteins that have been implicated in the development of human diseases. This includes, but is not limited to, the amyloid-causing D67H mutant form of human lysozyme that causes a number of renal and gastric amyloidoses (13, 14).

In this study we found that amyloid-causing lysozyme D67H is targeted to the ER of transfected HEK293 cells where it induces an unfolded protein response. Once at the ER it is a target for ubiquitination and proteasomal degradation. To demonstrate a role for Ubc6e in this pattern of degradation we co-transfected HEK293 cells to express lysozyme D67H and Ubc6e. This resulted in a decrease in steady state lysozyme D67H protein expression that could be reversed if cells were co-transfected with an inactive dominant negative Ubc6eC91S isoform. Studies are ongoing to purify recombinant Ubc6e and ERAD E3 enzymes so that we can re-constitute the ubiquitination of mutant lysozyme D67H in vitro.



Alunos: Bastos H.

Tutores: Ferreira J.

Laboratório, Centro ou Unidade: Instituto de Medicina Molecular / Unidade de Biologia da Cromatina (UBCR)

Telefone: 217999519

Fax: 217999418

E-mail:

Título: Detecção de formas de topoisomerase II $\alpha$  conjugadas com Sumo

Palavras-Chave: topoisomerase II $\alpha$ , sumo-1, sumo-2/3

As topoisomerasas são enzimas que controlam a topologia da molécula de DNA, o que é essencial para a execução de fenómenos nucleares como a replicação, a transcrição e a recombinação do DNA. As topoisomerasas de tipo II são as únicas capazes de decatenar moléculas de DNA pelo que são também essenciais ao processo de separação dos cromossomas durante a mitose. Em células de mamífero este papel é assegurado de forma predominante pela topoisomerase II $\alpha$ .

A topoisomerase II $\alpha$  é modificada pós-traducionalmente por fosforilação e por conjugação com pequenos péptidos homólogos da ubiquitina denominados de SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier), de que existem várias formas nomeadamente sumo-1, 2 e 3. Com o uso de inibidores de topoisomerase II (como o dexrazoxane), que retém sobre o DNA formas cataliticamente activas do enzima, foi verificado que estas se encontram conjugadas com sumo-1, durante a interfase. Pretendeu-se testar se, durante a mitose, esta conjugação é feita com a isoforma 2/3 como sugerido nos dados preliminares obtidos pelo grupo do Prof. João Ferreira e se a conjugação com sumo 2/3 é necessária à correcta segregação mitótica dos cromossomas mediada por topoisomerase II $\alpha$ .

Através da análise microscópica por imunofluorescência de células tratadas com dexrazoxane e células expostas ao solvente do fármaco (controlos) verificou-se que a retenção de formas cataliticamente activas de topoisomerase II $\alpha$  não se correlaciona com a retenção de sumo-1, mas com a de sumo-2/3; usando a técnica de *western blotting* para os mesmos grupos experimentais, detectaram-se formas modificadas de topoisomerase II $\alpha$ , caracterizadas pela sua maior massa molecular relativamente à banda padrão e verificou-se o aumento de proteínas conjugadas com sumo-2/3 numa região do gel localizada acima da banda padrão de topoisomerase II $\alpha$  foi realizado um estudo de *knock down* de topo II $\alpha$  com siRNA específico seguido de análise por imunofluorescência para testar se, na ausência de expressão de topoisomerase II $\alpha$ , existia retenção de sumo-2/3 sobre os cromossomas mitóticos. Verificou-se que o sumo-2/3 não se localiza nos cromossomas mitóticos na ausência de topoisomerase II $\alpha$ . Todos estes dados sugerem que a topoisomerase II $\alpha$  se conjuga com esta isoforma de sumo.

Fez-se ainda uma série de experiências para estudar o papel do padrão de fosforilação da topoisomerase II $\alpha$  e do ião cálcio na conjugação da topoisomerase II $\alpha$  com sumo 2/3.

Students: Hugo B.

Tutors: Ferreira J.

Laboratory, Centre, Unit: Instituto de Medicina Molecular / Unidade de Biologia da Cromatina (UBCR)

Phone: 217999519

Fax: 217999418

E-mail: [hjoao@fm.ul.pt](mailto:hjoao@fm.ul.pt)

---

Title: Detection of topoisomerase II $\alpha$  forms conjugated with sumo

---

Key-words: topoisomerase II $\alpha$ , sumo-1, sumo-2/3

---

Topoisomerases are enzymes that control the topology of the DNA molecule. This is essential for the execution of nuclear phenomena, namely replication, transcription and recombination of DNA. Type II topoisomerases are the only capable of decatenating DNA molecules and are thus essential to the process of separation of chromosomes during mitosis. In mammal cells this role is assured predominantly by topoisomerase II $\alpha$ .

Topoisomerase II $\alpha$  is modified by phosphorylation and conjugation with small peptides homologous to ubiquitin called SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier), of which 3 isoforms are currently known: sumo-1, 2 and 3. With the use of inhibitors of topoisomerase II (such as dexrazoxane), that stabilizes catalytically active forms of the enzyme on DNA, it was verified that, during interphase, topoisomerase II $\alpha$  conjugates predominantly to the sumo-1 isoform. Here we aimed at testing whether, during mitosis, catalytically committed forms of topoisomerase II $\alpha$  conjugate with sumo-1 or else, the 2/3 isoforms of sumo are utilized, as suggested in the preliminary data obtained by the group of the Prof. João Ferreira and whether the conjugation with sumo-2/3 is necessary to the correct segregation of mitotic chromosomes mediated by topoisomerase II.

Through microscopical analysis by immunofluorescence of cells exposed to dexrazoxane or solvent alone (control) it was verified that the retention of catalytically active forms of topoisomerase II $\alpha$  does not correlate with retention of sumo-1 but, instead with retention of sumo-2/3. Using the technique of western blotting on the same experimental groups, modified forms of topoisomerase II have been detected, which were characterized by their higher molecular mass relatively to the standard 170kDa band. A knock down study of topo II $\alpha$  using specific siRNA, followed by analysis by immunofluorescence was carried out to test whether, in the absence of expression of topoisomerase II, retention of sumo-2/3 on mitotic chromosomes still occurred. It was shown that sumo-2/3 does not remain on mitotic chromosomes in the absence of topoisomerase II $\alpha$ . These data suggest that topoisomerase II $\alpha$  conjugates with sumo 2/3, during mitosis.

A set of experiments was also performed to study the role of phosphorylation and calcium binding on the conjugation of topoisomerase II $\alpha$  with sumo-2/3.

Alunos: Alves JM.

Tutores: Melo Cristino J, Ramirez M.

Laboratório, Centro ou Unidade: Laboratório de Microbiologia

Telefone: 966125130 Fax: E-mail: [joamigalv@hotmail.com](mailto:joamigalv@hotmail.com)

Título: *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados em hemoculturas: bacteriemia ou contaminação?

Palavras-Chave: *Staphylococcus* coagulase-negativos, bacteriemia, contaminação

**Fundamento:** Os *Staphylococcus* coagulase-negativos são as bactérias que mais frequentemente se isolam em hemoculturas nos hospitais actualmente. Como fazem parte integrante da flora indígena cutânea são também os contaminantes mais frequentes. É essencial, por isso, quando se isolam em hemoculturas, poder saber se se trata de contaminação ou de bacteriemia verdadeira.

Nos doentes em que há isolamento desta bactéria em mais de uma hemocultura, se a estirpe isolada for idêntica em todas as colheitas, a probabilidade de se tratar de uma bacteriemia verdadeira é elevada. Por outro lado, se as estirpes isoladas forem de clones diferentes, ainda que da mesma espécie, provavelmente tratar-se-á de contaminação. A identificação bacteriana na rotina laboratorial baseia-se num conjunto de 18 provas bioquímicas o que poderá ser insuficiente para diferenciar clones bacterianos que, no caso de *Staphylococcus* coagulase-negativos, podem ter poucas diferenças nos parâmetros referidos. Assim, proceder-se-á à caracterização molecular por electroforese em campo pulsado (PFGE). Vários estudos usaram recentemente, com sucesso, técnicas de caracterização molecular semelhantes mas com objectivos diferentes.

Este trabalho tem aplicação clínica directa porque ao tratar-se de uma contaminação não há indicação para terapêutica antibiótica. Pelo contrário, se a bacteriemia é verdadeira, a terapêutica é mandatória e a infecção é habitualmente grave.

**Objectivos:** Conhecer a incidência de bacteriemia *versus* contaminação nos doentes com hemoculturas positivas com *Staphylococcus* coagulase-negativos. Avaliar se os métodos de rotina para identificação bacteriana e antibiograma são suficientes para a distinção entre bacteriemia e contaminação.

**Métodos:** Admite-se incluir no estudo todos os doentes com hemoculturas positivas nas condições descritas durante o período de um ano. A nossa amostra será de conveniência, consecutiva, em que as amostras que respeitem os critérios (duas ou mais hemoculturas do mesmo doente positivas para *Staphylococcus* coagulase-negativos num período não superior a dois dias) são seleccionadas. Como critério de exclusão temos o isolamento concomitante de outros microrganismos nas mesmas hemoculturas.

**Resultados:** A análise preliminar dos perfis de PFGE permite-nos dizer que as 18 provas bioquímicas não permitem a distinção entre estirpes diferentes por PFGE. Pelo contrário, a susceptibilidade aos 27 antibióticos testados distingue a maioria destas estirpes.

**Conclusões:** Com base nestes resultados preliminares, o antibiograma poderá ser usado como critério de distinção entre bacteriemia e contaminação estando em curso a determinação de quais os critérios a utilizar.

Students: Alves JM.

Tutors: Melo Cristino J, Ramirez M.

Laboratory, Centre, Unit: Laboratório de Microbiologia

Phone: 966125130

Fax:

E-mail: [joamigalv@hotmail.com](mailto:joamigalv@hotmail.com)

---

Title: *Staphylococcus* coagulase-negative isolated in blood sample: bacteraemia or contamination?

---

Key-words: *Staphylococcus* coagulase-negative, contamination, bacteraemia

---

**Background:** Nowadays, coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) is the bacteria more frequently isolated in hospitals. Because they are part of normal skin flora they are also the most frequent contaminants in blood cultures. It is essential, when isolated in blood culture, to know if they reflect a true bacteraemia or contamination.

In patients where this bacterium is isolated in more than one blood culture, if the same strain is isolated in all bottles, than the chance of being a true bacteraemia is extremely high. On the other hand, if the isolated strains are different, even if responsible for the same species, we probably have a contamination. Bacterial identification in clinical routine is based upon 18 biochemical tests that could prove not be enough to distinguish two clones. Because of that we will characterize the isolates by pulse-field gel electrophoresis. The importance of this work relies on the clinical consequences. If the CNS reflect contamination there is no indication for antibiotic therapeutic. On the other hand, when there is a true bacteraemia, therapy is mandatory and the infection serious.

**Objectives:** To know the incidence of bacteraemia *versus* contamination in patients with blood cultures positive for CNS. Evaluate if the routine methods of bacteria identification together with the 27 antibiotic susceptibility tests are sensitive enough to distinguish different strains.

**Methods:** We will include in the study all the patients with positive blood culture during a period of one year satisfying the inclusion criteria. Our sample will be consecutive; in which the samples that respect the inclusion criteria (two or more blood culture of the same patient positive for CNS in a period of no more than two days) will be selected. As exclusion criteria we have the isolation of another microorganism in the same blood culture.

**Results:** The preliminary analysis of the PFGE results allows us to say that the 18 biochemical tests do not allow to distinguish different strains by PFGE. On the other hand the susceptibility to the 27 antibiotics distinguishes the majority of these strains.

**Conclusions:** In view of these preliminary results the 27 antibiotic tests can be used to differentiate bacteraemia from contamination. The specific criteria for this distinction are the matter of current investigation.

