



## **COMUNICAÇÕES ORAIS (Sessão 1)**

Sexta-feira, 8 de março de 2019

(17h30 - 18h30)

### **SALA 4**

(CO Sessão 1 - 01 a CO Sessão 1 - 06)

## CO Sessão 1 - 01

### Oral – Investigação Fundamental

#### TREM-2 NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA: ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA INTESTINAL

Coelho I. <sup>1</sup>, Duarte N. <sup>1</sup>, Macedo M. P. <sup>2</sup>, Penha-Gonçalves C. <sup>1</sup>

1 - Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC), Investigação, Oeiras  
2 - CEDOC-UNL, APDP-ERC, Lisboa, Dep. Ciências Médicas, Universidade de Aveiro, Investigação

A microbiota intestinal estabelece uma relação de simbiose com o Homem crucial para a homeostasia do organismo. Diversos estudos têm demonstrado que alterações na microbiota modulam a permeabilidade intestinal, possibilitando a chegada de organismos patogénicos ou seus metabolitos à circulação, potenciando assim um estado crónico de inflamação, comum na patogénese da resistência à insulina e no desenvolvimento da diabetes tipo 2 (DT2). Foram descritas associações entre alterações da composição da microbiota e doenças hepáticas, como a doença do fígado gordo não alcoólica (NAFLD) e esteato-hepatite (NASH), conhecidas co-morbilidades da DT2 e obesidade.

*Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2* (Trem-2) é um receptor imune envolvido na ativação de macrófagos que tem um papel importante na fagocitose por parte da microglia em doenças neurodegenerativas. Além disso, vários estudos reportam o papel do Trem-2 na doença inflamatória do intestino, onde se observou que a ausência de Trem-2 previne colite.

Este trabalho teve como objetivo investigar a composição da microbiota intestinal durante a regeneração hepática e qual o impacto da expressão de Trem-2. Utilizámos um modelo crónico de fibrose hepática, induzido pela administração de tetracloreto de carbono (CCl4) e um modelo agudo, induzido pela administração de acetaminofeno. Ratinhos com e sem ablação de Trem-2 (Trem-2 KO) foram avaliados no tempo de regeneração hepática. Amostras de fezes foram recolhidas e a composição da microbiota intestinal avaliada através da sequenciação do 16 rRNA.

Observou-se um atraso na recuperação do dano hepático nos animais Trem-2 KO em relação aos animais *wild-type*, nos dois modelos. Relativamente à microbiota, observou-se alteração da sua composição, com diversidade reduzida e enriquecimento do filo Proteobacteria. No entanto, estas alterações foram idênticas entre os ratinhos *wild-type* e Trem-2 KO e não explicam o atraso na regeneração observado nos ratinhos Trem-2 KO. Surpreendentemente, observámos que os ratinhos Trem-2 KO controlo, sem indução de dano hepático, apresentam uma microbiota intestinal diferente dos *wild-type* indicando uma potencial susceptibilidade/resistência para outras doenças dependentes deste factor.

Estes resultados demonstram que a expressão de Trem-2 é crítica para a regeneração hepática independentemente da composição da microbiota. Além disso, os ratinhos Trem-2 KO têm uma composição da microbiota intestinal diferente da dos *wild-type*, sugerindo que a expressão de Trem-2 tem a capacidade de modular a microbiota intestinal.

## CO Sessão 1 - 02

### Oral – Investigação Fundamental

#### DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DMT2) ASSOCIADA A SÍNDROME DA APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO (SAOS): UM ESTUDO PROTEÓMICO

Rodrigues M. F. V. <sup>1</sup>, Marques C. <sup>2</sup>, Neves S. <sup>2</sup>, Penque D. <sup>2</sup>, Feliciano A. <sup>3</sup>, Antunes M. <sup>4</sup>, Pinto P. <sup>3</sup>, Barbara C. <sup>3</sup>, Coelho C. <sup>2</sup>

1 - Farmacêutica, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa  
2 - Bióloga, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa  
3 - Clínica, Serviço de Pneumologia, Centro Hospitalar de Lisboa Norte, Lisboa  
4 - Bioestatística, Centro de Estatística e Aplicações, Universidade de Lisboa

**Introdução:** A prevalência da SAOS é elevada em doentes com DMT2. O não tratamento da SAOS pode levar ao agravamento ou desenvolvimento da DMT2. Temos vindo a demonstrar que a SAOS altera o proteoma do glóbulo vermelho (GV). A SAOS aumenta a overoxidação da peroxirredoxina 2 (PRDX2) (enzima antioxidante), o que pode levar à desregulação da homeostasia do GV e ao desenvolvimento de doenças metabólicas. Após tratamento com ventilação não invasiva (PAP), esta overoxidação diminuiu seguida de um aumento de PRDX2 decamérica overoxidada com funções *chaperone* na proteção celular (Feliciano et al. 2017). No presente estudo, fomos investigar o estado redox/oligomérico da PRDX2 em doentes DMT2 com SAOS, antes/após PAP, para melhor compreender a interligação entre estas patologias.

**Material e Métodos:** Amostras de GVs de controlos (n=22 sendo 3 DMT2) e doentes SAOS antes/após 6 meses de tratamento com PAP (n=29 sendo 8 DMT2) foram analisadas por *western-blot* não reduzido, com anticorpo para a PRDX2 e PRDXSO<sub>2/3</sub> (over oxidada). Os grupos foram comparados estatisticamente e correlacionados com dados clínicos e bioquímicos.

**Resultados:** Nos GVs de doentes DMT2/SAOS, o nível de monómeros da PRDX2 mostrou-se aumentado e diminuía após PAP. Contudo, o nível destes monómeros PRDXSO<sub>2/3</sub> estava diminuído e não se alterou com o tratamento. Após PAP, o nível de decâmeros PRDX2SO<sub>2/3</sub> foi também menor nestes doentes. Os níveis de monómeros PRDX2 e PRDX2SO<sub>2/3</sub> correlacionaram-se negativamente com os níveis de insulina/triglicéridos e HbA1C, respetivamente. Após PAP, os níveis de decâmeros PRDX2SO<sub>2/3</sub> correlacionaram-se positivamente com os níveis de adrenalina.

**Conclusões:** O estado redox/oligomérico da PRDX2 do GV é diferencialmente modulado nos doentes DMT2/SAOS em comparação com doentes SAOS. Decâmeros PRDXSO<sub>2/3</sub> induzidos pelo tratamento e associadas à função protetora *chaperone* estão diminuídos em doentes DMT2/SAOS. O impacto clínico destas descobertas, necessita de mais investigação e validação.

## CO Sessão 1 - 03

### Oral – Investigação Fundamental

#### REVERSÃO DA DIETA RICA EM GORDURA PARA UMA DIETA NORMAL, NO INÍCIO DA IDADE ADULTA, PREVINE A SÍNDROME METABÓLICA MAS NÃO MELHORA A QUALIDADE ESPERMÁTICA

Crisóstomo L. <sup>1</sup>, Rato L. <sup>2</sup>, Jarak I. <sup>3</sup>, Silva B. M. <sup>2</sup>, Raposo J. F. <sup>4</sup>, Oliveira P. F. <sup>5</sup>, Alves M. G. <sup>6</sup>

- 1 - UMIB/ICBAS - UP, FMUP, i3S, GIFT, Investigação Fundamental, Porto  
 2 - FCS - UBI, Investigação Fundamental, Covilhã  
 3 - UMIB/ICBAS - UP, FCS - UBI, Investigação Fundamental, Porto  
 4 - NOVA Medical School, APDP, Diabetologia, Lisboa  
 5 - UMIB/ICBAS - UP, FMUP, i3S, Investigação Fundamental, Porto  
 6 - UMIB/ICBAS - UP, GIFT, Investigação Fundamental, Porto

Nas últimas décadas, a prevalência mundial das doenças metabólicas aumentou, principalmente devido a estilos de vida pouco saudáveis, com ênfase na adoção de dietas ricas em gordura (HFD). Simultaneamente assistiu-se a um declínio nas taxas de fertilidade e em parâmetros de fertilidade masculina. Porém, desconhecem-se os mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos das HFD na fertilidade masculina.

Neste trabalho postulamos que as HFD alteram a qualidade espermática e avaliamos os efeitos de uma reversão de dieta (HFD para dieta normal), no início da idade adulta, na prevenção de doenças metabólicas, no metabolismo testicular e qualidade espermática.

Para tal, 36 ratinhos C57BL6/J macho foram divididos num grupo controlo alimentado com uma dieta *standard* (hidratos de carbono: 61,6%, proteína: 20,5%, gordura: 7,2%); um grupo alimentado com HFD (hidratos de carbono: 35,7%, proteína: 20,5%, gordura: 36,0%) durante 200 dias; e um grupo alimentado com HFD durante 60 dias, aí substituída por uma dieta *standard* (HFDt). A massa corporal total e de cada órgão foram aferidas aquando do sacrifício. A função metabólica geral foi avaliada através dos testes intraperitoneais de Tolerância à Glicose (ipGTT) e de Resistência à Insulina (ipITT). A qualidade espermática epididimal foi caracterizada em termos de concentração, motilidade, viabilidade e morfologia.

Os nossos resultados demonstram que a reversão da dieta efetivamente reduz a massa corporal e a percentagem de massa gorda, e aumenta o índice gonadossomático. Esta recuperação é acompanhada por uma normalização da função metabólica geral, sendo que a glicémia em jejum e durante o ipGTT e o ipITT é mais elevada no grupo HFD que nos restantes grupos. A motilidade e a viabilidade espermáticas diminuíram por ação do consumo de HFD e não foram restaurados após reversão da dieta. Além disso, a percentagem de espermatozoides com defeitos morfológicos aumentou em todos os animais alimentados com HFD, mesmo temporariamente. Este é o primeiro estudo a demonstrar que o excesso de peso/obesidade, antes da idade adulta, pode causar danos irreversíveis à função testicular e à qualidade espermática, mesmo que a reversão da dieta recupere a função metabólica global.

## CO Sessão 1 - 04

### Oral – Investigação Fundamental

#### A SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO INDUZÍVEL INIBE A FORMAÇÃO DE CDRS DEPENDENTES DA INSULINA

Oliveira R. M., Correia M., Barral D., Macedo M. P.

CEDOC - Nova Medical School, Biologia Molecular, Lisboa

**Introdução:** A inflamação subclínica crónica tem sido associada ao desenvolvimento de prédiabetes e diabetes tipo 2. Está ainda fortemente relacionada com a sobreexpressão da enzima sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) e com o conseqüente aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico. Conseqüentemente, a expressão da enzima encontra-se drasticamente aumentada no fígado, músculo-esquelético e tecido adiposo de animais sujeitos a uma dieta gorda e em pacientes com diabetes. No fígado, a iNOS regula a sensibilidade à insulina e a sua sobreexpressão promove resistência à insulina, hiperglicemia e hiperinsulinemia. Dada a ligação entre a via de sinalização da insulina e o óxido nítrico/iNOS, quisemos explorar a forma como estes alteram a internalização do recetor da insulina (InsR). Anteriormente mostramos que o InsR é internalizado através de estruturas ricas em actina, as *circular dorsal ruffles* (CDRs), que se formam exclusivamente na superfície dorsal das células, 1 minuto após estimulação com insulina. Sendo a internalização do InsR fundamental para a ativação da respectiva via de sinalização, para além da sua metabolização e para a *downregulation* do recetor, colocamos a hipótese que a internalização do InsR mediada por CDRs é perturbada pela inflamação induzida por NO.

**Métodos:** Células Hepa 1-6 de fígado de ratinho foram utilizadas para estudar o tráfego intracelular do InsR. As células foram estimuladas com diferentes concentrações de insulina (50, 75 ou 100 nM) e em diferentes tempos. Para mimetizar uma situação de inflamação, efetuamos uma sobreexpressão da iNOS, durante 24 horas, realizando-se posteriormente o estímulo com insulina. Para observar a existência de CDRs após estimulação com insulina, as células foram fixadas e processadas para imunofluorescência, tendo sido marcadas com faloidina, um marcador de actina, e cortactina; e a percentagem de células que formam estas estruturas foi calculada.

**Resultados:** Após o estímulo com insulina, observamos a formação de CDRs, sendo este um processo dependente do tempo de exposição e da concentração desta hormona. Podemos ainda observar que o InsR se encontra localizado nestas estruturas. Após sobreexpressão da iNOS, ocorre uma diminuição drástica no número de hepatócitos que formam CDRs concomitante com a diminuição na ativação da via de sinalização da insulina, sugerindo que a inflamação promovida por excesso NO interfere com a internalização do InsR.

## CO Sessão 1 - 05

### Oral – Investigação Fundamental

#### AUSÊNCIA DA ENZIMA DEGRADADORA DA INSULINA NO FÍGADO AGRAVA SOBRECARGA DE GLICOSE PÓS PRANDIAL E FÍGADO GORDO NÃO ALCOÓLICO INDUZIDO POR DIETAS HIPERCALÓRICAS

Borges D. O. <sup>1</sup>, Penha-Gonçalves C. <sup>2</sup>, Macedo M. P. <sup>3</sup>

- 1 - Centro de Estudos de Doenças Crónicas - CEDOC, ITQB NOVA, Associação Protetora dos Diabéticos de Portugal - APDP, Investigação  
 2 - Instituto Gulbenkian de Ciência, IGC, Investigação, Lisboa  
 3 - CEDOC, NOVA Medical School, Universidade Nova de Lisboa, APDP –Centro para a Educação e Investigação, Departamento de Ciências Médicas, Universidade Aveiro, Investigação, Lisboa

**Introdução:** A enzima degradadora da insulina (EDI) está interligada ao metabolismo da glicose e o seu gene já foi associado a susceptibilidade da diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). A sua deleção específica no fígado afeta a resposta a sobrecarga de glicose pós prandial por mecanismos que não estão compreendidos. Além disso, a associação da EDI no fígado com as condições disglucémicas que acompanham a pré-diabetes não se encontra esclarecida. Este trabalho explora a hipótese que a ausência da EDI no fígado reduz a capacidade de degradação hepática de insulina, aumentando a sobrecarga de glicose pós prandial e exacerbando os efeitos lipogénicos da insulina em regimes hipercalóricos.

**Métodos:** Murganhos C57Bl/6 com o *locus* da EDI rearranjado para deleção condicional foram cruzados com animais que expressam a recombinase Cre sob o promotor do gene da albumina, resultando em animais com a deleção específica da EDI nos hepatócitos (F-EDI-KO). Animais C57Bl/6 normais e F-EDI-KO foram submetidos a uma dieta hipercalórica das 6 às 18 semanas de idade. A Prova de Tolerância a Glicose Oral (PTGO) foi realizada após esse período, com recolha de sangue para a avaliação da depuração/*clearance* da insulina hepática. Após o sacrifício, a resposta hepática foi avaliada por histopatologia e por quantificação de triglicéridos.

**Resultados:** A dieta hipercalórica causou a esperada sobrecarga de glicose pós prandial em animais normais. Contudo, animais F-EDI-KO apresentaram um significativo incremento nas excursões glicémicas, conforme calculado pela área sobre a curva durante a PTGO. A depuração sérica de insulina foi afetada pela dieta hipercalórica em animais normais, presumivelmente devido a uma diminuição na actividade da EDI causada pela dieta hipercalórica. Com isso, F-EDI-KO e animais normais em dieta hipercalórica apresentaram uma depuração sérica de insulina semelhante. Porém, F-EDI-KO apresentaram um significativo agravamento do fígado gordo não alcoólico observado não só nos resultados histo-patológicos, mas também na dosagem de triglicéridos no fígado.

**Conclusão:** Estes resultados indicam que a EDI tem um relevante papel na degradação hepática da insulina, contribuindo para a redução dos seus efeitos lipogénicos. Sua contribuição, nomeadamente na redução da acumulação/síntese intra-hepática de triglicéridos, parece ser fundamental para o desenvolvimento do fígado gordo não alcoólico e da sobrecarga glicémica pós prandial em indivíduos expostos a dieta hipercalórica.

## CO Sessão 1 - 06

### Oral – Investigação Fundamental

#### PROTEOSTASE NO TECIDO ADIPOSEO EPICARDIAL DE PACIENTES COM DEFICIÊNCIA CARDÍACA COM OU SEM DIABETES

Fonseca A. C. R. G. <sup>1</sup>, Burgeiro A. <sup>1</sup>, Lourenço N. <sup>2</sup>, Antunes M. <sup>3</sup>, Carvalho E. <sup>4</sup>

- 1 - Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Investigação, Coimbra  
 2 - Centro de Informática e Sistemas, Universidade de Coimbra, Investigação, Coimbra  
 3 - Unidade de Cirurgia Cardiorrástica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Cardiologia, Coimbra  
 4 - Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Department of Geriatrics, University of Arkansas for Medical Sciences, Investigação, Coimbra e Arkansas

**Introdução:** As doenças cardiovasculares são a principal causa de morbilidade e mortalidade na população diabética. Os tecidos adiposos têm um papel importante na regulação do metabolismo e o tecido adiposo epicardial (TAE) regula a fisiologia do coração e dos vasos sanguíneos. Os mecanismos de controlo de qualidade proteica são finamente regulados de forma a garantir uma proteostase funcional e consequentemente uma adequada homeostase cardíaca.

**Objetivos:** O objectivo deste trabalho foi estudar de que forma a proteostase está alterada no TAE em comparação com o tecido adiposo subcutâneo de pacientes com insuficiência cardíaca com e sem diabetes.

**Métodos:** A expressão de diversos genes e proteínas marcadores de autofagia (AMPK, mTOR, Beclin-1, LC3-I e LC3-II, Lamp2, p62 e PINK1), do stress do retículo endoplasmático (RE) (GRP78, GRP94, IRE1 $\alpha$ , PERK), ubiquitinação proteica e apoptose (CHOP, caspase-4, Bim e Bcl-2) foram analisados por RT-PCR e *Western blot*, respectivamente, no TAE e subcutâneo de indivíduos diabéticos e não diabéticos recolhidos durante operações cardíacas no Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra.

**Resultados:** Existe um aumento da expressão dos níveis de mRNA ( $p \leq 0,001$ ) de vários marcadores do stress do RE (GRP78, GRP94, PERK, CHOP) no TAE quando comparado com o tecido adiposo subcutâneo o que também se reflete a nível da expressão proteica ( $p \leq 0,05$ ) para GRP78, GRP94. A expressão de mRNA de PERK, IRE1 $\alpha$  está também aumentada ( $p \leq 0,05$ ) em pacientes diabéticos. A razão entre os níveis de caspase-4 e pro-caspase-4, um marcador da apoptose induzida pelo stress do RE, está também aumentada ( $p=0,01$ ) em doentes diabéticos. Verificou-se ainda, através de *Western blot*, qRT-PCR, e imunohistoquímica, um aumento dos marcadores de autofagia ( $p \leq 0,05$ ) (AMPK, mTOR, Beclin-1, LC3-I e LC3-II, Lamp2, p62 e PINK1) no TAE em doentes com deficiência cardíaca. Além disso, os níveis de mRNA de Bim (pró-apoptótico) e Bcl-2 (anti-apoptótico) estavam aumentados no TAE, mas a razão entre ambos não se mostrou significativamente alterada.

**Conclusão:** A ativação do stress do RE e da autofagia no TAE estão associados com as doenças cardíacas e diabetes. Este estudo poderá levar à identificação de novos biomarcadores para estados iniciais das cardiomiopatias e possíveis alvos terapêuticos.