



COMUNICAÇÕES ORAIS (Sessão 1)

Sexta-feira, 6 de março de 2020

(17h30 - 18h30)

SALA 4

(CO Sessão 1 - 01 a CO Sessão 1 - 06)

CO Sessão 1 - 01

Oral – Investigação Fundamental

WVOX NA NEURODEGENERESCÊNCIA ASSOCIADA À DIABETES: UMA RELAÇÃO AGRIDOCE?

Carvalho C. ¹, Seiça R. ², Moreira P. I. ³

- 1 - CNC, CIBB, III (Instituto Inv. Interdisciplinar), Universidade de Coimbra, Portugal, Investigação, Coimbra
- 2 - Instituto de Fisiologia, iCBR, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal, Investigação, Coimbra
- 3 - CNC, Universidade de Coimbra, Portugal; Laboratório de Fisiologia – Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal, Investigação, Coimbra

Introdução: A diabetes tipo 2 (DT2) é uma doença metabólica atualmente considerada uma epidemia da era moderna. Diversos estudos epidemiológicos mostram que doentes com DT2 apresentam um risco acrescido para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, nomeadamente doença de Alzheimer (DA), tornando-se assim urgente compreender quais os mecanismos subjacentes à morte neuronal em contexto de diabetes.

Objetivos: Este estudo teve como principal objetivo compreender os mecanismos moleculares envolvidos na neurodegeneração associada à DT2, dando particular ênfase ao possível envolvimento da proteína oxiredutase contendo o domínio WW (WVOX), como gatilho da disfunção mitocondrial e morte de células neuronais.

Material e Métodos: Neste estudo foram avaliados os níveis de WVOX ativada em córtex cerebral de ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo espontâneo, não obeso, de DT2, com 6- e 14-meses de idade. Adicionalmente, foram efetuados estudos em células diferenciadas de neuroblastoma humano SH-SY5Y expostas a níveis elevados de glicose. No modelo *in vitro* foi avaliado o padrão de ativação da WVOX e vários parâmetros mitocondriais de forma a tentar esclarecer a interação da WVOX com a mitocôndria.

Resultados: Nas amostras de córtex cerebral dos ratos GK observámos que os níveis de proteína WVOX ativada era superior em animais mais jovens. Curiosamente, nas células SH-SY5Y diferenciadas expostas a níveis elevados de glicose os níveis da WVOX ativada ocorrem após 24h de incubação. Também a este tempo de incubação se observou um aumento dos níveis de p53 e acumulação do complexo de partículas proteicas (TPC6A) na mitocôndria, proteínas que interagem fisicamente com a WVOX, de um modo dependente do seu estado de ativação. Curiosamente, as alterações nas proteínas descritas anteriormente, parecem preceder a disfunção mitocondrial, ativação de caspases e morte neuronal, os quais se encontram significativamente alterados após 48h de exposição a níveis elevados de glicose. Por último, e sabendo que uma acumulação de TPC6A na mitocôndria potencia a formação do peptídeo β -amilóide, um dos marcadores patológicos da DA, também observámos um aumento dos níveis deste peptídeo neurotóxico.

Conclusão: Estes resultados sugerem que, em condições de hiperglicemia, a ativação da proteína WVOX poderá estar na origem da morte neuronal associada à DT2, revelando-se um potencial alvo terapêutico para prevenir alterações cognitivas e demência associada à diabetes.

Trabalho financiado por fundos Europeus da FEDER, através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE 2020 (HealthyAging2020: CENTRO-01-0145-FEDER-000012) e pela FCT (PEst-C/SAU/LA0001/2013-2014).

CO Sessão 1 - 02

Oral – Investigação Fundamental

DELEÇÃO DA ENZIMA DEGRADADORA DA INSULINA NO FÍGADO DIMINUI A CAPTAÇÃO HEPÁTICA DE GLICOSE CONTRIBUINDO PARA O AUMENTO DAS EXCURSÕES PÓS-PRANDIAIS DE GLICOSE

Borges D. O. ¹, Duarte N. ², Penha-Gonçalves C. ³, Macedo M. P. ⁴

- 1 - CEDOC/NMS MOLBIOS PhD Program/ITQB Universidade NOVA de Lisboa, Investigação, Lisboa
- 2 - Instituto Gulbenkian de Ciência - IGC, Oeiras, Portugal, Investigação Básica
- 3 - Instituto Gulbenkian de Ciência - IGC, Oeiras, Portugal, Genética
- 4 - CEDOC, NOVA Medical School, Univ. NOVA de Lisboa, Portugal/ APDP-Centro para a Educação e Invest., Lisboa, Portugal/ Departamento de Ciências Médicas, Univ. de Aveiro, Portugal, Investigação Translacional

Introdução: O aumento das excursões pós-prandiais (PP) de glicose é a condição mais frequente em indivíduos com pré-diabetes. Neste contexto, a hiperinsulinemia compensatória observada está atribuída a uma desregulação na *clearance* hepática de insulina (CHI) e/ou um aumento da secreção de insulina. A deleção específica do gene da principal enzima envolvida na CHI, a enzima degradadora da insulina (EDI), no fígado de animais (F-EDI-KO) reproduz o aumento de excursões de glicose PP, comprovando o papel da EDI na CHI. Contudo, não é conhecido o efeito da redução da degradação intracelular de insulina no metabolismo hepático, e mais especificamente na glicose plasmática. Este trabalho explorou a hipótese de que a redução da degradação de insulina no fígado pela EDI afecta a expressão dos transportadores de glucose (GLUT), diminuindo a capacidade de internalização hepática e contribuindo para o aumento das excursões glicémicas PP.

Métodos: Murganhos C57Bl/6 com a deleção condicional da EDI em hepatócitos e *wild type* (WT) foram utilizados e submetidos a dieta controlo (CTL) ou hipercalórica. A avaliação da expressão do gene do principal GLUT hepático, o *Glut2*, foi avaliada em fígados de F-EDI-KO e respectivos WT, bem como a sua expressão proteica. Para estimar a capacidade de captação de glicose nos hepatócitos isolados de animais F-EDI-KO e WT, estes foram submetidos a um ensaio *ex vivo* onde foi avaliada a captação de um análogo de glicose fluorescente.

Resultados: F-EDI-KO apresentaram diminuição da CHI e uma redução na expressão de mRNA de *Glut2* associada a um aumento da excursão de glicose PP. Nos animais WT em dieta hipercalórica observou-se uma diminuição semelhante no mRNA dos *Glut2*, paralela a uma diminuição da actividade da EDI no fígado. Os níveis proteicos de *Glut2* acompanharam as alterações génicas, sugerindo uma menor capacidade de internalização de glicose. Em hepatócitos isolados de F-EDI-KO, a captação de glicose mostrou-se significativamente diminuída quando comparados com hepatócitos WT.

Conclusão: Estes resultados indicam que a expressão hepática de EDI é fundamental para a homeostasia da glicose PP e sugerem que a hiperinsulinemia compensatória suprime a expressão proteica de *Glut2*. Alterações na CHI mediadas pela EDI parecem ter um impacto fisiopatológico na progressão para a diabetes tipo 2.

CO Sessão 1 - 03

Oral – Investigação Fundamental

A DOPAMINA MODULA A CAPTAÇÃO DE GLUCOSE NOS TECIDOS SENSÍVEIS À INSULINA VIA RECEPTORES D1 E D2 E ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DE DIFERENTES VIAS DE SINALIZAÇÃO

Tavares G. ¹, Melo B. F. ², Martins F. O. ², Matafome P. ¹, Conde S. V. ²

1 - Instituto de Fisiologia e Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR), Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Investigação, Coimbra

2 - Centro de Estudos de Doenças Crónicas (CEDOC), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Investigadora, Lisboa

Introdução: A dopamina é um mediador celular com importantes funções a nível central no metabolismo da glucose estando a bromocriptina, um agonista dos recetores D2 dopaminérgicos, aprovada pela FDA para o tratamento da diabetes tipo 2. A dopamina é produzida nos tecidos periféricos, como o pâncreas, rim, fígado e o tecido adiposo, contudo, os seus efeitos locais nos tecidos sensíveis à insulina não são conhecidos. Este trabalho investigou o papel da dopamina e seus recetores na captação da glucose pelos tecidos sensíveis à insulina e no seu metabolismo.

Materiais e Métodos: Estudou-se a captação de glucose em ratos Wistar machos quer: 1) *in vivo*, na qual foi administrada um *bolus* de glucose marcada, [³H]2-deoxyglucose (100μCi), por gavagem seguida de um *bolus* i.v. com diferentes doses de dopamina (0.1-10uM) quer; 2) *Ex vivo* nos tecidos sensíveis à insulina: fígado, músculo sóleo e tecido adiposo branco (TA). Os explantes foram incubados com dopamina (10μM) ou bromocriptina (BR) (10μM), na presença ou ausência de insulina (I), do antagonista do recetor D2, domperidona (DOMP, 50nM) ou de haloperidol (HAL, 500nM), antagonista D1 e D2. Foram analisados por Western Blot a fosforilação do recetor da insulina (IR-Tyr972) e da AMPK.

Resultados: A dopamina (100nmol) aumentou a captação da glucose nos tecidos *in vivo*. *Ex vivo*, a dopamina aumentou a captação da glucose no musculo sóleo, e a BR no fígado, efeitos estes bloqueados pelo HAL e pela DOMP, respetivamente. No fígado a dopamina aumentou a ativação da AMPK, efeito que foi anulado na presença de DOMP. No TA a dopamina ou BR não aumentaram a captação de glucose, mas potenciaram o efeito da insulina. No TA observou-se: 1) aumento do IR-Tyr972 após incubação com insulina, efeito que é diminuído pela BR, mas que aumenta após incubação com DOMP; 2) diminuição da ativação da AMPK na presença de BR, efeito revertido pela DOMP.

Conclusão: No TA, dopamina e BR potenciam a captação da glucose mediada pela insulina, contudo, a inibição do D2R potencia a fosforilação do IR e aumenta a ativação da AMPK. No fígado, os recetores D2R modulam a captação de glucose e a fosforilação da AMPK ao contrário do músculo no qual parecem ser os recetores D1 a ter um papel na captação de glucose. Podemos concluir que os diferentes recetores de dopamina estão envolvidos na captação de glucose nos diferentes tecidos sensíveis à insulina por ativação de diferentes vias de sinalização.

Financiamento: FCT (UID/NEU/04539/2013; PD/BD/127822/2016), Sociedade Portuguesa de Diabetes e Generis por fornecer a bromocriptina.

CO Sessão 1 - 04

Oral – Investigação Fundamental

A GLICAÇÃO CEREBRAL POTENCIA DISFUNÇÃO MOTORA, COGNITIVA E OLFATIVA DE RATINHOS QUE SOBRE-EXPRESSAM ALFA-SINUCLEÍNA

Chegão A. ¹, Miranda H. V. ², Coelho J. E. ³, Temido-Ferreira M. ³, Marques-Morgado I. ³, Guarda M. ¹, Lopes L. V. ³, Outeiro T. F. ¹

1 - Universidade NOVA de Lisboa, NOVA Medical School, CEDOC, Investigação, Lisboa

2 - Universidade NOVA de Lisboa, NOVA Medical School, CEDOC, Neurociências, Lisboa

3 - Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes, Investigação, Lisboa

Introdução: Vários estudos demonstram que a diabetes tipo II é um fator de risco para o desenvolvimento da doença de Parkinson. Em condições de hiperglicemia, os neurónios são vulneráveis ao excesso de açúcares redutores, que levam à formação de produtos avançados de glicação (AGEs). Recentemente, demonstrámos que a formação destes AGEs na alfa-sinucleína, uma proteína chave na doença de Parkinson, potencia a sua patologia associada e pode determinar a morte neuronal. É por isso essencial determinar se a glicação da alfa-sinucleína poderá explicar a associação entre as duas patologias e se é um fator determinante para o aparecimento de várias manifestações típicas da doença de Parkinson.

Objectivos: Neste estudo pretendemos avaliar em modelos animais se a glicação no cérebro poderá induzir alterações comportamentais e bioquímicas tipicamente observadas na doença de Parkinson.

Material e Métodos: Neste estudo recorremos a ratinhos que sobreexpressam alfa-sinucleína no cérebro (Thy1-hSyn) com 16 semanas, nos quais foi injetada uma dose única de 0.45 μmol de metilglioxal (agente glicante) ou uma solução controlo, por via intra-ventricular. 4 semanas após cirurgia, foi avaliada a capacidade motora, cognitiva e olfativa dos animais, bem como foram efetuadas análises bioquímicas em várias regiões cerebrais.

Conclusão: Após realização de testes comportamentais tais como o "pole" e "rota-rod" (motor); "Y-maze" (cognitivo); e "block" (olfativo), verificámos que a glicação induz disfunção motora, cognitiva e olfativa. Acresce que os níveis totais de alfa-sinucleína aumentam em algumas zonas cerebrais como o córtex, estriado e mesencéfalo, factor que se sabe contribuir para a patogenicidade desta proteína. Os nossos resultados sugerem que a glicação contribui para o desenvolvimento de manifestações tipicamente presentes na doença de Parkinson. De futuro, propomos estudar a eficácia de fármacos com potencial anti-glicante no modelo animal descrito, de forma a identificar uma nova abordagem terapêutica para a doença de Parkinson, e que possa igualmente prevenir o surgimento desta patologia em doentes com diabetes tipo II.

CO Sessão 1 - 05

Oral – Investigação Fundamental

TREM-2 CONTROLA A DINÂMICA DE MACRÓFAGOS DURANTE A REGENERAÇÃO HEPÁTICA

Coelho I. ¹, Duarte N. ², Barros A. ², Penha-Gonçalves C. ², Macedo M. P. ³

1 - Instituto Gulbenkian de Ciência; CEDOC, Nova Medical School, Investigação, Lisboa

2 - Instituto Gulbenkian de Ciência, Investigação, Oeiras

3 - CEDOC, Nova Medical School; Departamento de Ciências Médicas, Universidade de Aveiro; APDP- Centro para a Educação e Investigação, Lisboa, Professora e Investigadora, Lisboa

A doença não alcoólica do fígado gordo (NAFLD) está intimamente associada à diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2), tendo sido demonstrado que a NAFLD ocorre em mais de 70% dos pacientes com diabetes tipo 2. Além disso, a progressão de esteatose hepática para fibrose é frequente, sendo que 20% dos pacientes com DMT2 e NAFLD desenvolvem esta condição.

Os macrófagos, células do sistema imunitário inato, desempenham um papel fundamental na resposta inflamatória e de reparação tecidual durante lesões hepáticas agudas e crónicas e em danos hepáticos associados a distúrbios metabólicos, tais como a esteatose hepática e esteatohepatite.

A expressão do recetor Trem-2 em macrófagos tem sido associada a uma diminuição da resposta inflamatória, atuando como mediador da ativação e sobrevivência de macrófagos.

Este trabalho teve como objetivo perceber o impacto do Trem-2 na dinâmica de macrófagos durante o processo de regeneração hepática, utilizando como modelos experimentais a administração de acetaminofeno (APAP) para indução de um dano agudo e de tetracloreto de carbono (CCl4) para indução de um dano crónico, em ratinhos *wild-type* e Trem-2 KO.

Observou-se que enquanto os ratinhos *wild-type* recuperaram do dano hepático, os ratinhos Trem-2 KO demonstraram persistência de necrose tecidual no tempo de regeneração hepática, após o tratamento agudo e crónico. Ambos os tratamentos levaram ao desaparecimento das células Kupffer (macrófagos residentes do fígado), sendo estas recuperadas nos ratinhos *wild-type* mas não nos Trem-2 KO. Durante a recuperação tecidual, os macrófagos recrutados da medula óssea, em transição para o compartimento celular de Kupffer, expressam níveis elevados de Trem-2 e demonstram um perfil transcricional único denotando uma forte resposta ao stress oxidativo e o *shut down* da resposta pró-inflamatória. Além disso, a ablação genética de Trem-2 promoveu a acumulação de uma população de células endoteliais associadas ao dano hepático (LDECs) envolvidas em um programa transcricional compatível com a desdiferenciação endotelial.

Esses resultados revelam que a dinâmica dos macrófagos hepáticos é controlada pelo Trem-2 e que esta está relacionada com a desdiferenciação das células endoteliais e a persistência da patologia. Desta forma, propomos que o Trem-2 medeia a transição da fase pró-inflamatória para a reparação tecidual, promovendo a aquisição de propriedades restauradoras de macrófagos.

CO Sessão 1 - 06

Oral – Investigação Fundamental

A REGULAÇÃO DO ENZIMA QUE DEGRADA A INSULINA APRESENTA POTENCIAL TERAPÊUTICO NUM MODELO CELULAR DE DOENÇA DE PARKINSON

Guarda M. ¹, Chegão A. ², Gomes B. F. F. ³, Marçal A. R. ⁴, Sousa L. ², Macedo M. P. ⁵, Miranda H. V. ⁵

1 - CEDOC, NOVA Medical School, Investigação, Lisboa

2 - CEDOC, NOVA Medical School, Estudante de doutoramento, Lisboa

3 - CEDOC, NOVA Medical School, Bolseira de investigação, Lisboa

4 - CEDOC, NOVA Medical School, Estudante de mestrado, Lisboa

5 - CEDOC, NOVA Medical School, Investigador principal, Lisboa

Introdução: Estudos epidemiológicos recentes indicam que indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) têm maior risco de desenvolvimento da doença de Parkinson (DP). Além disso, a concomitância de ambas as doenças acelera a disfunção motora e acentua o declínio cognitivo típico da DP. A DP é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda de neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta*, que se traduz principalmente em várias manifestações motoras. A acumulação e agregação da alfa-sinucleína (aSin) é tida como determinante da perda neuronal. Embora, os mecanismos moleculares subjacentes à associação entre estas patologias não sejam claros, observou-se que no pâncreas de doentes com DM2, os níveis do enzima que degrada a insulina (EDI) diminuem e correlacionam-se negativamente com os de aSin. Mais ainda, verificou-se que o EDI não degrada a aSin, mas interage e impede a agregação e toxicidade da aSin em células beta do pâncreas. Desta forma, temos por hipótese que a potenciação do EDI no cérebro possa ter eficácia terapêutica para a DP.

Materiais e Métodos: Para investigar a patogénese da aSin, usámos um modelo *in vitro* baseado na sobre-expressão da aSin, ou de uma variante mais propensa a agregação (SinT) em células cerebrais. Explorámos o potencial papel protetor do EDI pela sobre-expressão da proteína nativa (EDI-WT) ou de uma variante sem função de degradação (EDI-E111Q). A citotoxicidade foi avaliada pela determinação dos níveis de lactato desidrogenase libertados. Os níveis totais de aSin e a sua solubilidade e agregação foram analisados por *western blot* e por imunocitoquímica.

Resultados: Observámos que as duas variantes do EDI protegem da citotoxicidade induzida pela aSin, o que sugere que a proteção não depende da atividade de degradação do EDI. Paradoxalmente, a sobre-expressão do EDI resulta num aumento dos níveis de aSin. Uma vez que esta aSin é menos citotóxica, investigámos se o EDI previne a formação de espécies oligoméricas e mais tóxicas da aSin. De facto, o EDI-E111Q aumenta a solubilidade da SinT em Triton X-100. Mais ainda, as duas variantes do EDI favorecem a formação de inclusões maiores, descritas como sendo menos tóxicas.

Conclusões: Com este estudo concluímos que o EDI, ao suprimir a patogenicidade da aSin, pode ter um papel protetor importante no contexto da DP. Propomos assim que a potenciação do EDI neuronal, poderá prevenir o desenvolvimento ou a progressão da DP, em especial em doentes com DM2.