



COMUNICAÇÕES ORAIS (Sessão 4)

Sábado, 7 de março de 2020

(08h30 - 09h30)

SALA 4

(CO Sessão 4 - 19 a CO Sessão 4 - 24)

CO Sessão 4 - 19

Oral – Investigação Fundamental

NEUROPEPTÍDEO MELHORA A FUNÇÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DIABÉTICAS

Leal E. C., Figueiredo A., Carvalho E.

Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Investigação, Coimbra

Introdução e Objetivos: A neuropatia diabética periférica representa um risco significativo de úlceras crônicas. A diabetes leva à redução da angiogénese na ferida, em parte, pela disfunção das células progenitoras endoteliais (CPEs). No entanto, o papel dos neuropeptídeos na função das CPEs é desconhecido. Este trabalho visa a avaliar o papel da neurotensina na função das CPEs na cicatrização de feridas diabéticas.

Material e Métodos: A diabetes em murganhos foi induzida por streptozotocina (STZ, intraperitoneal, 50 mg/kg/dia, 5 dias). Após 6 semanas de diabetes procedeu-se à indução de feridas ou isolamento das CPEs da medula óssea. As CPEs de murganhos normais foram incubadas em alta glicose (25 mM) ou normoglicemia (5,5 mM) e tratadas com neurotensina (25-400 nM). As CPEs isoladas de murganhos diabéticos também foram tratadas com neurotensina (100 nM). A função das CPEs foram avaliadas por medição de viabilidade (MTT), ensaios de adesão e medição de espécies reativas de oxigénio (ERO). Para o modelo de cicatrização, foram criadas feridas de 6 mm de diâmetro no dorso. O fecho das feridas foi avaliado até 10 dias após a indução. As feridas foram tratadas com CPEs derivadas de medula óssea diabética e/ou incubadas com neurotensina (100 nM) por 3 dias, ou veículo. A angiogénese foi avaliada por imunohistoquímica com CD31, um marcador de células endoteliais.

Resultados: A glicose elevada diminuiu a viabilidade das CPEs e a neurotensina, em concentrações acima de 100 nM, reverteu esse efeito. A neurotensina reverteu a menor viabilidade (73% das CPEs controlo, $p < 0,05$), a adesão diminuída (58% do controlo, $p < 0,05$) e os níveis elevados de ERO (148% do controlo, $p < 0,05$) das CPEs diabéticas. As feridas tratadas com CPEs diabéticas incubadas com neurotensina apresentavam uma menor área de ferida no dia 10 (4% do tamanho original da ferida) quando comparadas com as tratadas com CPEs ou veículo (32% e 35% do tamanho original da ferida, respectivamente, $p < 0,05$). Além disso, as CPEs diabéticas tratadas com neurotensina aumentaram a angiogénese no local da ferida (153% do veículo, $p < 0,05$) quando comparadas às CPEs diabéticas (115% do veículo) e veículo.

Conclusões: Esses resultados mostraram que a neurotensina possibilita uma melhoria da viabilidade das CPEs em condições diabéticas, diminuindo o *stress* oxidativo, o que possibilitou restaurar a função das CPEs diabéticas e melhorar a cicatrização de feridas por um aumento da angiogénese.

Financiamento: FCT, EFSD, SPD/GIFT

CO Sessão 4 - 20

Oral – Investigação Fundamental

EXOSSOMAS DERIVADOS DO INTESTINO COMO MENSAGEIRO DE PRÉ-DIABETES

Ferreira I. ¹, Oliveira R. ¹, Matthiesen R. ¹, Costa-Silva B. ², Macedo P. ¹

1 - CEDOC Nova Medical School, Investigação, Lisboa

2 - Fundação Champalimaud, Investigação, Lisboa

Introdução: No sentido de prevenir a diabetes tipo 2 (DT2) é crucial a deteção e intervenção precoce, nomeadamente na pré-diabetes. De salientar que a cirurgia bariátrica, mesmo antes da acentuada perda de peso, tem elevadas taxas de sucesso na remissão da DT2, demonstrando assim a importância de olhar para o intestino como órgão metabolicamente ativo e potencial alvo no diagnóstico precoce e intervenção terapêutica. A homeostasia metabólica é atingida através de uma intrincada comunicação entre os diversos órgãos; recentemente foi descrito um novo modo de comunicação no organismo: os exossomas. Estes são pequenas vesículas extracelulares capazes de transferir material proteico e genético de uma célula para outra distante. Sabendo que os enterócitos libertam exossomas, colocamos a hipótese de que o ambiente intestinal, no contexto da dieta hipercalórica, é alterado e estas alterações serão traduzidas no conteúdo proteico dos exossomas derivados do intestino (EDI), propagando desta forma a patologia.

Métodos: Murganhos C57Bl/6J foram expostos a dieta hipercalórica e dieta normal durante 12 semanas, com posterior confirmação de fenótipo pré-diabético. Os exossomas foram isolados diretamente do intestino a partir de um processo de separação por gradiente de densidade, marcados e posteriormente analisados a nível de tamanho, partir de um equipamento de rastreio de nanopartículas, e conteúdo proteico, por espectrometria de massa e consequente análise proteómica com ferramentas bioinformáticas.

Resultados: Foi interessante observar que as proteínas presentes nos EDI de animais hiperglicémicos estão maioritariamente envolvidas em funções metabólicas como por exemplo glicólise e gluconeogénese. Ainda, de realçar, a maior diferença observada no que toca a proteínas muito menos expressas nos exossomas provenientes de dieta hipercalórica são proteínas envolvidas no funcionamento do proteossoma, ou seja, em mecanismos de degradação molecular; e as proteínas mais expressas nestes exossomas, em comparação com os provenientes de dieta normal, são proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos gordos. Vimos ainda que estes exossomas são maioritariamente captados pelo fígado e em particular pelas células de Kupffer.

Conclusão: Este trabalho sugere que os EDI realmente transportam uma mensagem que reflete a condição a que as células de origem estão expostas. Este estudo sugere ainda que os EDI medeiam um importante eixo de comunicação na DT2, o eixo entero-hepático.

CO Sessão 4 - 21

Oral – Investigação Fundamental

EFEITOS DE TRATAMENTOS *IN VIVO* COM OLANZAPINA E ARIPIPRAZOL NA EXPRESSÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM RATOS *WISTAR*

Silva J. D.¹, Santos D. 1, Sarsenbayeva A. 2, Figueiredo A.¹, Nunzio G. D.¹, Santamaria R.¹, Pereira M. J.², Jones J.¹, Carvalho E.¹

1 - Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra (CNC), Coimbra, Portugal, Investigação

2 - Department of Medical Sciences, Clinical Diabetes and Metabolism, Uppsala University, Investigação, Uppsala, Sweden

Introdução: A esquizofrenia é uma doença do foro psicológico com severas consequências nas capacidades cognitivas, sociais e emotivas. Embora ainda não exista uma cura efetiva, antipsicóticos de segunda geração, como a *Olanzapina* (Ola) e o *Aripiprazol* (Ari), são frequentemente utilizados para o controlo da doença. Contudo, o uso destes antipsicóticos leva ao desenvolvimento de efeitos secundários metabólicos dos quais não se conhecem bem os mecanismos associados, tais como ganho de peso, resistência à insulina e diabetes. Estes efeitos levantam questões não só a nível de saúde como também económicas. **Objetivo:** Este estudo pretende avaliar o efeito *in vivo* do tratamento agudo e crónico com Ola e Ari em ratos *Wistar*, de forma a elucidar qual o mecanismo responsável pela alteração metabólica e respetivo impacto a nível inflamatório.

Métodos: No estudo agudo, 24 ratos *Wistar* foram divididos aleatoriamente em 3 grupos aleatórios e tratados com veículo (Ctr), Ola ou Ari (5 mg/kg) por gavagem. Após uma hora, a gordura subcutânea (SWAT) e visceral (VWAT), fígado e músculo gastrocnémio foram recolhidos, após sacrifício, para posterior análise. No estudo crónico, 18 ratos *Wistar* foram divididos aleatoriamente em 2 grupos e tratados diariamente com Ctr ou Ola (5 mg/kg) por via intraperitoneal durante 6 semanas. Após uma noite de jejum, estes foram sacrificados e os mesmos tecidos recolhidos. A expressão dos marcadores inflamatórios foi obtida através de RT-qPCR e a análise de citocinas pelo kit LEGENDplex™ Rat Th Cytokine Panel (13-plex).

Resultados: No estudo agudo, a expressão dos marcadores pro-inflamatórios tende a aumentar, principalmente com Ola, em ambas as gorduras quando comparadas com Ctr. No estudo crónico, há um aumento significativo de IL-1b e CD11c (cerca de 200%, $p < 0,05$) na SWAT, enquanto que na VWAT, verifica-se o oposto, nomeadamente de IL-6 (cerca de 50%, $p \leq 0,05$). Os marcadores anti-inflamatórios tendem a aumentar em ratos tratados com Ola ou Ari, sendo significativo apenas para TGF-b (cerca de 150%, $p \leq 0,05$) no Gas (crónico). Não foram observadas diferenças a nível da expressão de citocinas.

Conclusão: O aumento da expressão de marcadores pro-inflamatórios no tecido adiposo também é observado em condições de obesidade e diabetes, uma vez que está diretamente relacionado com o aumento da resistência à insulina. Consequentemente, a libertação destes marcadores pode também afetar diversos processos metabólicos em vários órgãos, incluindo o fígado e o músculo.

CO Sessão 4 - 22

Oral – Investigação Fundamental

A INIBIÇÃO DE MIR-146A E MIR-29A PROMOVE A CURA DE FERIDAS EM UM MODELO ANIMAL DE DIABETES TIPO 1

Petkovic M.¹, Leal E.¹, Sørensen A. E.², Ottosen E. K.², Jørgensen P. T.³, Wengel J.³, Carvalho E.¹, Dalgaard L. T.²

1 - Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Investigação, Coimbra, Portugal

2 - Roskilde University, Department of Science and Environment, Investigação, Roskilde, Denmark

3 - University of Southern Denmark, Investigação, Odense, Denmark

Introdução e Objetivos: As úlceras diabéticas crónicas (DFUs) são caracterizadas por níveis elevados de inflamação, deficiente vascularização e re-epitelização. O papel dos microRNAs miR-146a e miR-29a não é conhecido na cicatrização de feridas em diabetes. Este trabalho pretende avaliar o efeito da inibição do miR-146a e miR-29a (individualmente ou em combinação), na cicatrização de feridas *in vitro* e em um modelo animal de diabetes tipo 1.

Materiais e Métodos: A diabetes foi induzido em murghanos com streptozotocina (50mg/kg, ip, 5 dias consecutivos). Seis semanas após a indução do diabetes, foram induzidas 2 feridas de 6 mm de diâmetro e estas foram tratadas duas vezes por dia até o dia 3 com os inibidores de miR-146a e/ou miR-29a ou com controlo negativo. A cinética de cicatrização de feridas foi avaliada até o dia 10. As espécies reactivas de oxigénio (EROs) foram avaliadas pela di-hidroetidina (DHE). A angiogénese foi avaliada pela marcação de CD31 por imunohistoquímica. Os ensaios de migração *in vitro* (células HaCAT) foram feitos após a transfeção com os inibidores de miR-146a ou miR-29a.

Resultados: A inibição de ambos miR-146a e miR-29a (2,5 nM) diminuiu significativamente a cinética de fecho de feridas ($p < 0,003$ dia 8; $p < 0,02$ dia 9) em comparação com a inibição individual de cada miR bem como com o controlo negativo (2,5 nM). A combinação dos dois miRs melhorou significativamente a angiogénese. As EROs não foi alterada com a inibição do miR-29a, no entanto, estava aumentada com a inibição do miR-146a ($p = 0,04$) e diminuída com o tratamento combinado dos dois miRs ($p = 0,04$). A inibição do miR-146a ou do miR-29a melhorou a migração dos queratinócitos HaCAT, após 24 horas.

Conclusões: A inibição dos miRs miR-146a e miR-29a parece melhorar o fecho da ferida por um aumento da angiogénese, uma diminuição da produção de EROs, e um aumento na migração de queratinócitos. Esses estudos sugerem que a inibição do miR-146a e miR-29a podem ser um potencial alvo terapêutico em feridas crónicas diabéticas, no entanto, são necessários mais estudos para suportar estes resultados.

Fundos: FCT, EASD, SPD/GIFT

CO Sessão 4 - 23

Oral – Investigação Fundamental

TERAPIA NÃO-VIRAL COM DUPLA AÇÃO ANTI-ANGIOGÉNICA: POTENCIAL PARA A RETINOPATIA DIABÉTICA

Araújo R. S., Bitoque D. B., Silva G. A.

CEDOC- Centro de Estudos de Doenças Crónicas, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Investigação, Lisboa

A Retinopatia Diabética (RD) é uma das principais complicações associadas à progressão da Diabetes *Mellitus* e a principal causa de perda de visão em indivíduos em idade laboral a nível mundial. A RD é uma doença que evolui de forma progressiva, sendo que a RD proliferativa poderá envolver neovascularização e hemorragia dos novos vasos sanguíneos.

Às terapias existentes encontram-se associados vários efeitos secundários, e cerca de 30% dos doentes não respondem às terapêuticas. Estes dados levam à necessidade de encontrar outros fatores que poderão estar implicados na progressão da doença e que poderão ser estudados enquanto alvos terapêuticos. Neste contexto, evidências demonstram que o fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF) poderá ter um efeito terapêutico na doença, possuindo funções neuroprotectoras, anti-angiogénicas e anti-inflamatórias. O PEDF encontra-se diminuído no vítreo de doentes com RD, potenciando a progressão da doença. Contrariamente, existem evidências de que o fator de crescimento placentário (PIGF) possui uma importante ação pro-angiogénica, encontrando-se em elevados níveis no vítreo de doentes com RD. Neste estudo analisámos o potencial terapêutico do restauro do equilíbrio entre fatores promotores e inibidores da angiogénese na retina, sendo que a sua forte desregulação é apontada como sendo a principal causa de neovascularização em RD. Para tal, desenvolvemos um sistema binário que simultaneamente expressa o PEDF e um shRNA direcionado ao gene do PIGF, e avaliamos o seu impacto num modelo animal de RD, após injeção subretinal.

Os nossos resultados evidenciam um aumento significativo dos níveis de PEDF na retina neural e no epitélio pigmentar da retina (RPE) dos ratinhos diabéticos *Ins2Akita*, assim como uma diminuição significativa dos níveis de PIGF, 21 dias após a injeção. Adicionalmente, verificamos uma redução dos níveis de VEGF e das moléculas pro-inflamatórias IL-1 β e Iba1. Concomitantemente, observamos uma diminuição acentuada da permeabilidade vascular na retina e a regressão da neovascularização em ratinhos com 11 meses, após uma única injeção subretinal, sem qualquer impacto na densidade das células ganglionares.

Este estudo demonstra o potencial terapêutico do restauro do equilíbrio entre fatores pró- e antiangiogénicos na retina, representando uma possível futura estratégia para o tratamento de doentes com RD.

CO Sessão 4 - 24

Oral – Investigação Fundamental

FOLHAS DE *ACROCOMIA ACULEATA* (JACQ.) LODD EX MART. AUMENTAM AS DEFESAS ANTIOXIDANTES E MELHORAM O PERFIL METABÓLICO EM RATOS DIABÉTICOS TIPO 2

Monteiro-Alfredo T. ¹, Oliveira S. ², Antunes K. ³, Santos J. ³, Aquino D. ⁴, Magalhaes M. ², Cabral C. ², Seica R. ², Oliveira C. ³, Picoli K. ³, Matafome P. ⁵

1 - Instituto de Fisiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra; Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra, Investigação, Coimbra, Portugal

2 - iCIBR; CIBB, Investigação, Coimbra, Portugal

3 - GEBBAM, Investigação, Dourados, Brasil

4 - UEMS, Investigação, Dourados, Brasil

5 - iCIBR; CIBB; ESTeSC, Investigação, Coimbra, Portugal

Introdução: O stress oxidativo é considerado um dos principais mecanismos fisiopatológicos da diabetes *mellitus* (DM). A polpa do fruto da *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. é utilizada no tratamento da DM, mas até o momento, não existem relatos das propriedades de suas folhas. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante e o efeito metabólico do extrato aquoso das folhas de *A. aculeata* (EA-Aa).

Material e Métodos: A atividade antioxidante de EA-Aa foi avaliada através de ensaios de viabilidade celular e de imunocitoquímica em células Cos-7 induzidas com H₂O₂ e marcadas com sondas específicas de espécies reativas de oxigênio (EROs), *Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate* (DCFH-DA) e *Dihydroethidium* (DHE). Em sequência, determinaram-se níveis de proteínas envolvidas na resposta ao stress por *Western Blot*. Para a avaliação do efeito metabólico de EA-Aa, ratos Wistar (W) e diabéticos não-obesos Goto-Kakizaki (GK) com 12 semanas de idade, foram tratados diariamente com EA-Aa 200 mg.kg⁻¹ durante 30 dias e parâmetros bioquímicos foram monitorizados. Após o tratamento, foram anestesiados e amostras de sangue foram colhidas, e, de seguida, os ratos foram sacrificados para colheita dos órgãos. Níveis de insulina, triglicérides, ácidos gordos e proteínas associadas foram determinados por ELISA e *Western Blot*. Os procedimentos com animais foram aprovados pelo ORBEA 13/2018.

Resultados: EA-Aa promoveu a diminuição da marcação das sondas DCFH-DA e DHE, demonstrando uma redução da geração de EROs em células Cos-7, promovendo igualmente o aumento dos níveis de Sirt-1, ERK, Nrf2 e catalase, importantes mediadores da resposta antioxidante celular. O aumento das proteínas Sirt-1 e Nrf2 também foi observado no tecido adiposo epididimal dos ratos diabéticos após tratamento com o extrato. Estes efeitos foram acompanhados por uma melhoria dos triglicérides séricos e maiores níveis de PPAR γ no grupo GK-EA-Aa. Apesar de não se verificarem alterações no perfil glicémico, observaram-se maiores níveis de GLUT4 no tecido adiposo no mesmo grupo.

Conclusão: O efeito antioxidante comprovado de EA-Aa nas células Cos-7 está provavelmente associado a ativação da via Sirt-1/Nrf2, o que também foi visto nas análises de tecido adiposo epididimal, que apresentou níveis superiores das proteínas da resposta antioxidante, bem como um aumento das proteínas GLUT-4 e PPAR γ , importantes mediadores da função metabólica.

Agradecimentos: FUNDECT, CAPES, CNPq e FCT.