

Do ensino em auto-aprendizagem até à investigação pré-clínica: UBI-FCS um case study

Luís António Paulino Passarinha^{a,b,c}

^aCICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, 6201-506 Covilhã, Portugal

^bUCIBIO@REQUINTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

^cLaboratório de Fármaco-Toxicologia-*UBIMedical*, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal



Modelo de Ensino Inovador

1 - A criação de um modelo pedagógico que substitua o sistema de ensino “tradicional”, de adição de cadeiras, por um sistema de ensino integrado, baseado no estabelecimento de objetivos e recorrendo, sempre que possível, à aprendizagem baseada em problemas.

2- Ênfase na aprendizagem por parte do aluno, em detrimento dos processos que conduzem ao “armazenamento” de informação, sendo imprescindível colocar ênfase na aprendizagem, no binómio “ensino-aprendizagem”, entendendo o ensino como um sistema para a facilitar.

3- Controlo continuado da metodologia pedagógica.

(Resolução Conselho de Ministros nº140/98, 4 de Dezembro)

1ª Fase – Apresentação de Objectivos

Objectivos do Modulo

Peroxisomas e Retículo Endoplasmático

- Compreender e caracterizar a origem da formação dos peroxissomas.
- Caracterizar a estrutura dos peroxissomas.
- Identificar as funções mais relevantes dos peroxissomas.
- Caracterizar morfologicamente o retículo endoplasmático liso e rugoso.
- Indicar a composição e funções mais relevantes do retículo endoplasmático liso e rugoso.

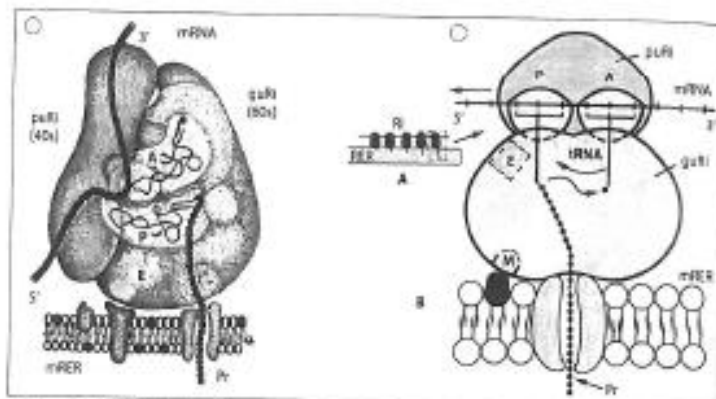




FIGURA 13.10 – Representação de ribossomas e sua ligação à membrana do RER.  = Modelo semiquemístico;  = Modelo esquemático. Nestes esquemas representam-se as pequena (puRi) e grande subunidades (guRi) ribossômicas e o trajeto do mRNA. No interior, assinalam-se os centros de ligação (A), peptídios (P), de ligação à membrana (M) e de saída dos tRNAs (E). Representam-se também os tRNAs aminoacil e peptídios localizados, respectivamente, no centro A e centro P. Pr – proteínas mRER – membrana do retículo endoplasmático.

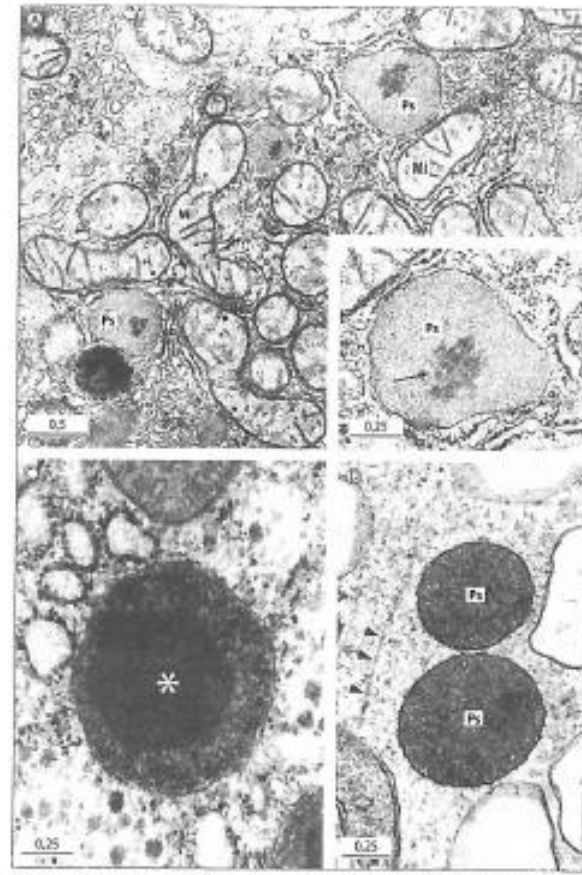


FIGURA 18.3 – A e B – Nos hepatócitos de rato, os peroxissomas (Pr) contêm um nucleóide polilobular denso (setas). Mi – mitocôndrias (fotografias gentilmente cedidas pelo Prof. Manuel Magalhães). C – Peroxisoma de glândula digestiva (hepatopâncreas) do gastrópode marinho *Gibbula umbilicata*, contendo um grande nucleóide com secção hexagonal (*). D – Peroxisomas (Pr) sem nucleóide na glândula digestiva do corangéjio *Corvus monax*. Um microtúbulo (setas de seta) pode ser observado junto a estes organelos. Barras em μm .

2ª Fase – Discussão e Consolidação dos Conteúdos



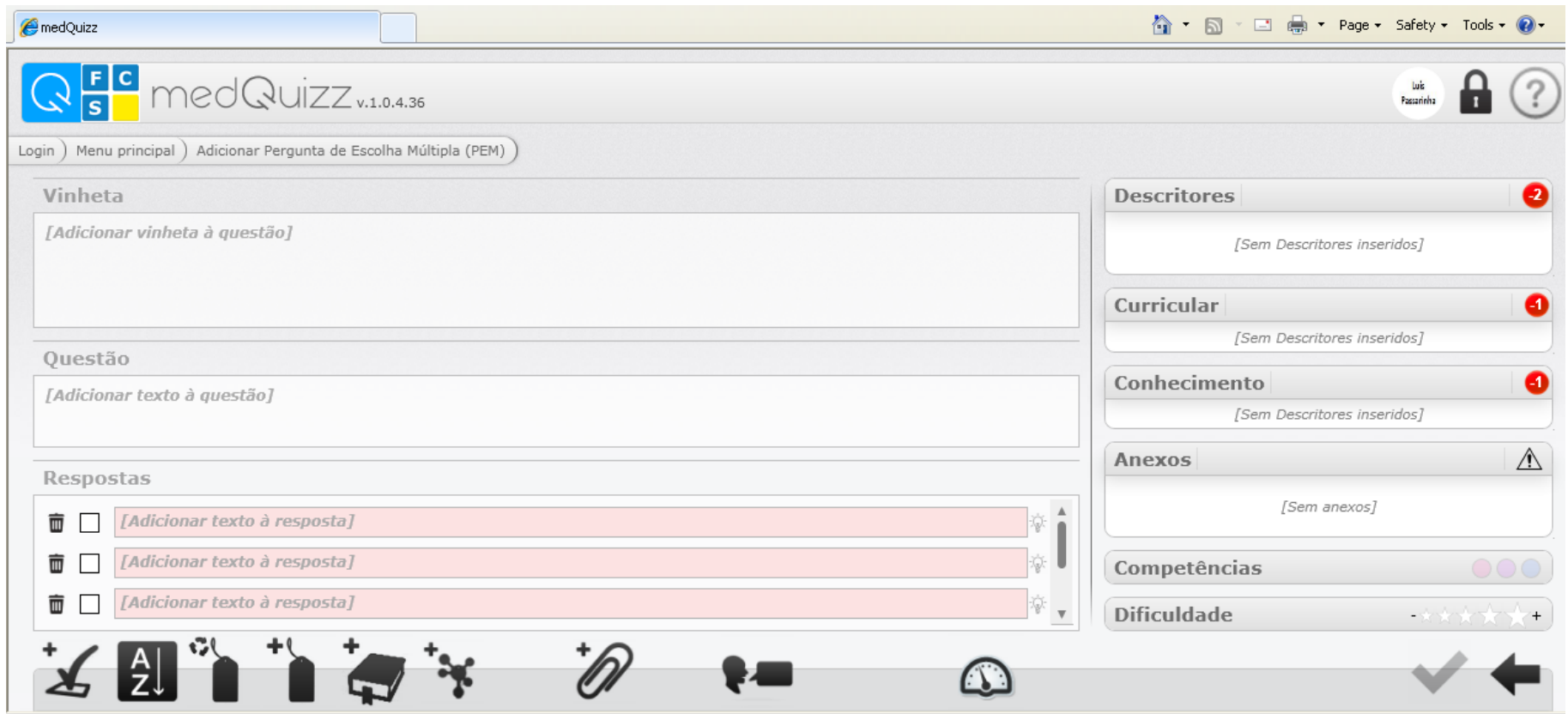
- Num sistema de base tutorial os grupos de trabalho (25 alunos) apresentam os objectivos do modulo, tendo em consideração a bibliografia fornecida.
- O tutor tem a função de moderar, dinamizar e fomentar o processo de aprendizagem colocando questões, integrando a matéria e colocando problemas para que o aluno apresente soluções com base nos conceitos, definições e integrações efectuadas.

3ª Fase - Avaliação de Conhecimentos

- Deve ser válida e fiável
- Utiliza instrumentos (perguntas/testes) de correcção objectiva
- Utiliza meios informáticos na realização, na correcção e na análise dos resultados



Plataforma medQuizz



The screenshot shows the medQuizz v.1.0.4.36 interface. The browser address bar shows 'medQuizz'. The top navigation bar includes 'Login', 'Menu principal', and 'Adicionar Pergunta de Escolha Múltipla (PEM)'. The main content area is divided into sections for editing a question:

- Vinheta:** A text area containing the placeholder '[Adicionar vinheta à questão]'. A red '-2' indicator is visible in the top right corner of this section.
- Questão:** A text area containing the placeholder '[Adicionar texto à questão]'.
- Respostas:** Three text input fields, each with a trash icon and a checkbox on the left, and a lightbulb icon on the right. Each field contains the placeholder '[Adicionar texto à resposta]'. A vertical scrollbar is on the right side of this section.

On the right side, there are several panels for question configuration:

- Descritores:** A panel with a red '-2' indicator, containing the text '[Sem Descritores inseridos]'.
- Curricular:** A panel with a red '-1' indicator, containing the text '[Sem Descritores inseridos]'.
- Conhecimento:** A panel with a red '-1' indicator, containing the text '[Sem Descritores inseridos]'.
- Anexos:** A panel with a warning icon, containing the text '[Sem anexos]'.
- Competências:** A panel with three colored circles (pink, purple, blue).
- Dificuldade:** A panel with a star rating system showing five stars.

The bottom toolbar contains various icons for editing and saving, including a checkmark, a keyboard icon, a trash can, a plus sign, a book, a network icon, a paperclip, a speech bubble, a clock, a checkmark, and a back arrow.

Modelos de Perguntas

Perguntas de escolha múltipla (PEM)

- ✓ enunciado + pergunta
- ✓ 5 hipóteses de resposta das quais apenas uma está correcta
- ✓ não sei/não respondo

EXEMPLO

<Q> Qual é o substrato inicial da beta-oxidação? (recomendado)
 ou O substrato inicial da beta-oxidação é:

- <C+> Acil coenzima A
- <C> Acetil coenzima A
- <C> Ácido gordo
- <C> Carnitina
- <C> Triacilglicerol
- <C> Não sei/não respondo

NOTAS

Para evitar as respostas ao acaso, cada pergunta errada desconta na classificação, em função do número de opções de resposta. Neste caso de 5 opções, o valor a descontar é de $\frac{1}{4}$ do valor da pergunta.

A introdução da hipótese 'Não sei/não respondo' dá a possibilidade ao aluno de optar por não responder à pergunta já depois de ter seleccionado uma resposta, pois o software utilizado não o permite fazer.

Modelos de Perguntas

Perguntas de escolha múltipla (PEM)

- ✓ enunciado + pergunta
- ✓ 5 hipóteses de resposta das quais apenas uma está correcta
- ✓ não sei/não respondo

EXEMPLO

<Q> Qual é o substrato inicial da beta-oxidação? (recomendado)
 ou O substrato inicial da beta-oxidação é:

- <C+> Acil coenzima A
- <C> Acetil coenzima A
- <C> Ácido gordo
- <C> Carnitina
- <C> Triacilglicerol
- <C> Não sei/não respondo

NOTAS

Para evitar as respostas ao acaso, cada pergunta errada desconta na classificação, em função do número de opções de resposta. Neste caso de 5 opções, o valor a descontar é de $\frac{1}{4}$ do valor da pergunta.

A introdução da hipótese 'Não sei/não respondo' dá a possibilidade ao aluno de optar por não responder à pergunta já depois de ter seleccionado uma resposta, pois o software utilizado não o permite fazer.

Modelos de Perguntas (PEM)

Pontos fortes

- permitem medir todos os níveis cognitivos (da memorização simples à resolução de problemas)
- permitem avaliar todos os conteúdos relacionados com os objectivos – podem ser construídos testes com número suficiente de perguntas para avaliar toda a matéria.
- permitem obter resultados altamente fiáveis
- permitem correcção automática

Pontos fracos

- difíceis de construir - é mais fácil fazer perguntas que apenas avaliem capacidade de memorização do que níveis cognitivos mais elevados
- demoradas de construir
- os resultados são influenciados pela capacidade de interpretação dos alunos e pela capacidade de escrita de quem as faz

PEM – Recomendações Técnicas

Utilizar vocabulário que esteja ao nível dos alunos a quem se dirige a pergunta.

Evitar o uso de frases que sejam transcrições de livros (mesmo que tenham um “truque” que as torne erradas podendo ser reconhecidas pelos alunos como certas).

Evitar o uso de conhecimento demasiado específico (exemplo: qual é a percentagem de doenças raras; qual a prevalência no EU).

Ter cuidado com a construção de frases, evitando frases na negativa, quer no enunciado e formulação da pergunta, quer nas opções de resposta.

PEM – Recomendações Técnicas

**Evitar o uso de termos
imprecisos e subjectivos**

Geralmente
Por vezes
Raro/raramente
Habitualmente
Frequente
.....

O que é raro, frequente, habitual para umas pessoas ou em alguns países pode não o ser para outros.

No geral, encontram-se estes termos nas respostas correctas e os alunos que não sabem terão isso em conta quando tiverem que responder.

PEM – Recomendações Técnicas

Não fazer depender a pergunta da opinião do aluno

NÃO

<Q> Qual dos seguintes exames considera o mais importante no diagnóstico dos tumores cerebrais?

SIM

<Q> Qual dos seguintes exames é o mais importante no diagnóstico dos tumores cerebrais?

Comentários

Na verdade, o que se está a perguntar é o que o aluno acha que está correcto. E, na sua perspectiva, pode estar correcta uma resposta diferente daquela que é a correcta de acordo com a bibliografia.

PEM – Recomendações Técnicas

Evitar pistas de convergência

NÃO

<Q> Paracelso continua a aceitar a existência da teoria dos quatro elementos, mas afirma que cada um é formado por três princípios:

- <C> mercúrio, enxofre, magnésio
- <C> sódio, terra, éter
- <C> enxofre, mercúrio, sal
- <C> mercúrio, sal, água
- <C> enxofre, zinco, potássio

Comentários

As palavras mercúrio e enxofre são repetidas 3 vezes. Estas duas palavras aparecem simultaneamente em duas hipóteses de resposta (1ª e 3ª). Resta saber se será sal ou magnésio. Mas como sal aparece duas vezes e magnésio apenas uma, há fortes probabilidades que a resposta certa seja a 3ª. E é!!!

Portanto, quando nas opções se repetem os mesmos elementos mas com diferentes combinações, a resposta certa é, com frequência, a que contém os elementos mais repetidos.

PEM – Recomendações Técnicas

Usar distractores plausíveis



NÃO

<Q> Um homem de 60 anos foi levado ao Serviço de Urgência pela polícia que o encontrou inconsciente na rua. Após verificação de que a via aérea se encontrava desobstruída, deverá proceder-se à administração de:

- <C> exame do líquido cefaloraquidiano.
- <C> glicose com vitamina B1 (tiamina).
- <C> TAC da cabeça.
- <C> fenitoína.
- <C> diazepam.



Comentários

Apenas 3 das hipóteses correspondem a substâncias que podem ser administradas, as restantes são exames. Um aluno que não sabe irá seleccionar uma daquelas hipóteses e terá 1/3 das probabilidades de acertar.

RM – Perguntas de Resposta Múltipla

- ✓ enunciado + pergunta
- ✓ 3 (recomendado) a 5 hipóteses de resposta das quais uma ou mais estão correctas

EXEMPLO

<Q> Quais das seguintes hormonas são segregadas pela hipófise anterior?

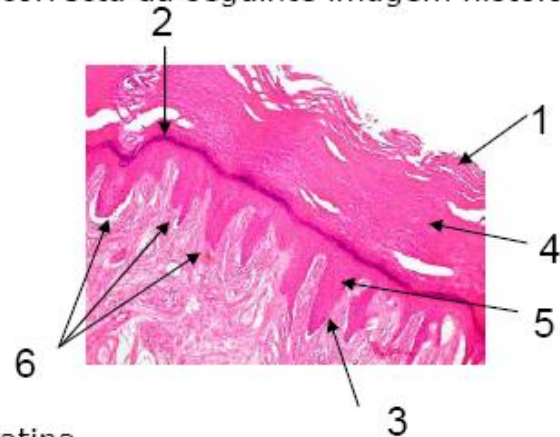
- <C+> Hormona de crescimento
- <C+> Prolactina
- <C> Vasopressina
- <C> Ocitocina

NOTAS

Para evitar respostas ao acaso, estas perguntas só são consideradas certas se o aluno responder correcto a todas as opções.

Perguntas "Pull-Down"

<Q> Faça a legenda correcta da seguinte imagem histológica de tecido epitelial:



- A. queratina
- B. camada granulosa
- C. camada basal
- D. zona com células cubóides
- E. zona com células pavimentosas
- F. papilas dérmicas

<C+> A-1

<C+> B-2

<C+> C-3

<C+> D-5

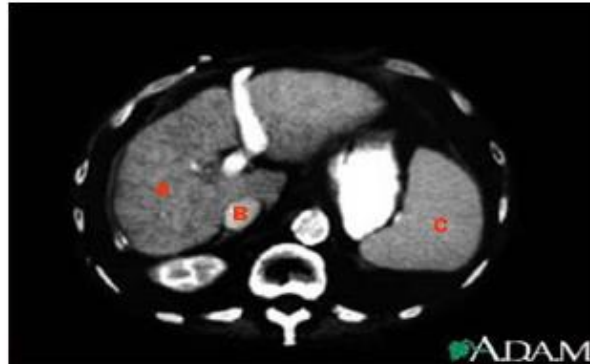
<C+> E-4

<C+> F-6

Esta pergunta é do tipo "pull-down". No teste, os alunos terão que 'clique' numa janela que está à frente do nome de cada estrutura e aparece uma lista de números de 1 a 6 para seleccionar.

Perguntas “Pull-Down”

<Q>Em relação à imagem de uma TAC da região abdominal, identifique os órgãos representados por A, B e C.



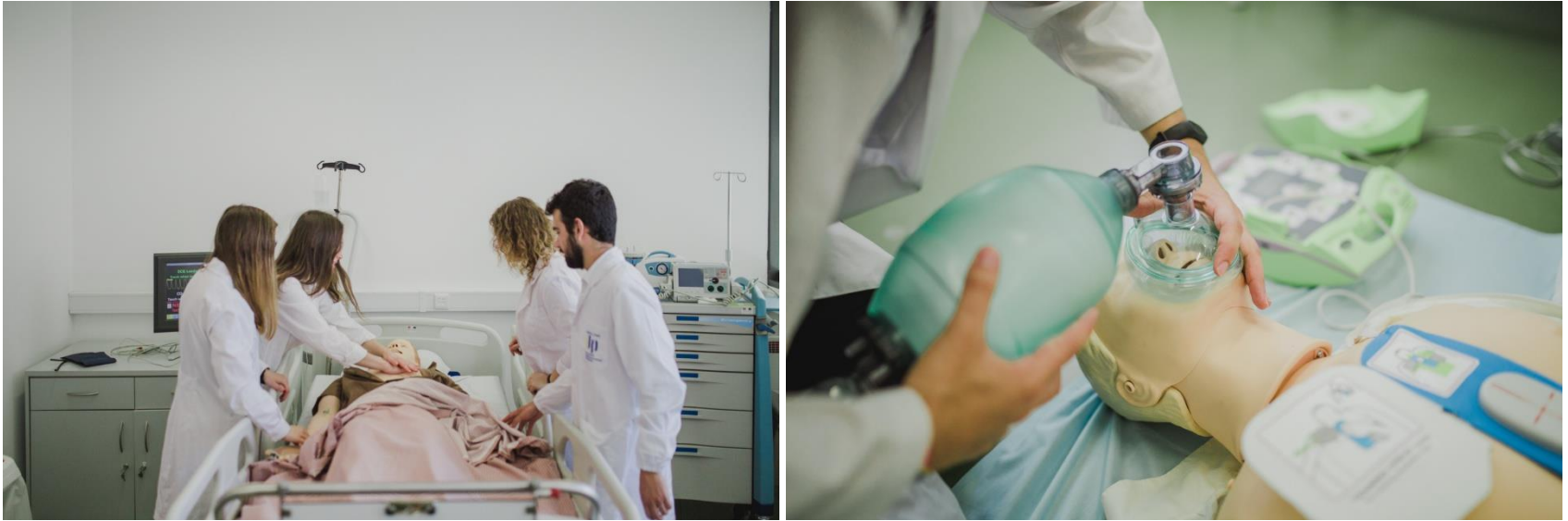
LISTA DE PULL-DOWN

pâncreas
estômago
fígado
duodeno
baço
vesícula biliar
cego
baço

<C+> A - fígado
<C+> B - vesícula biliar
<C+> C - baço

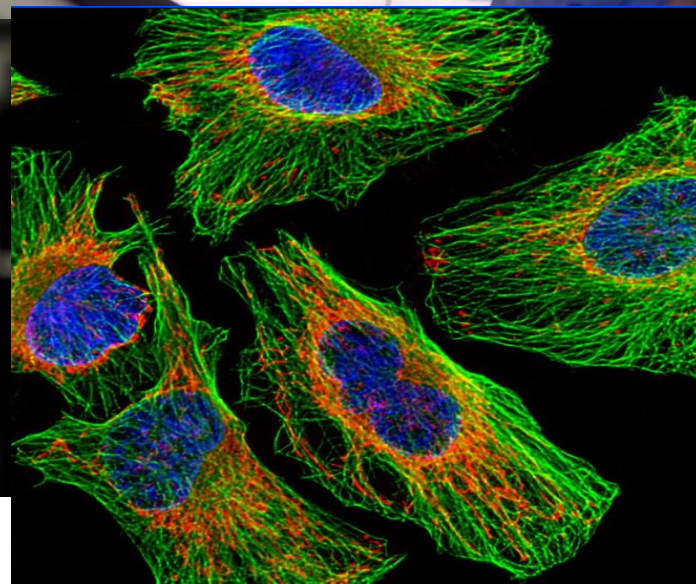
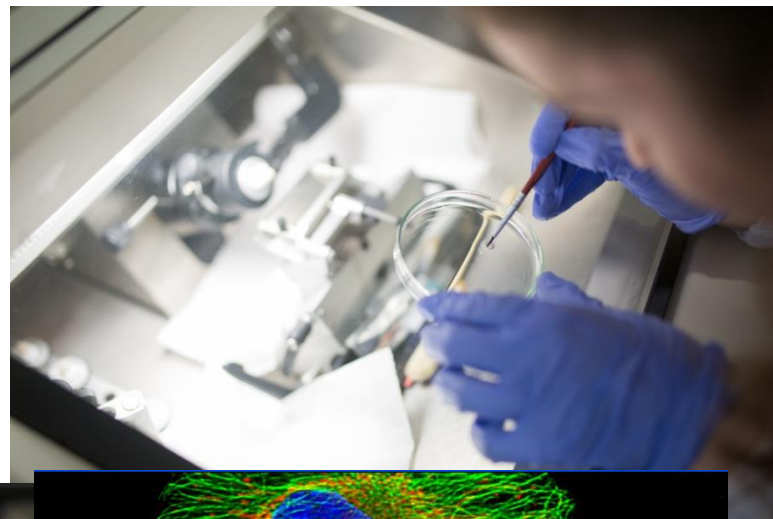
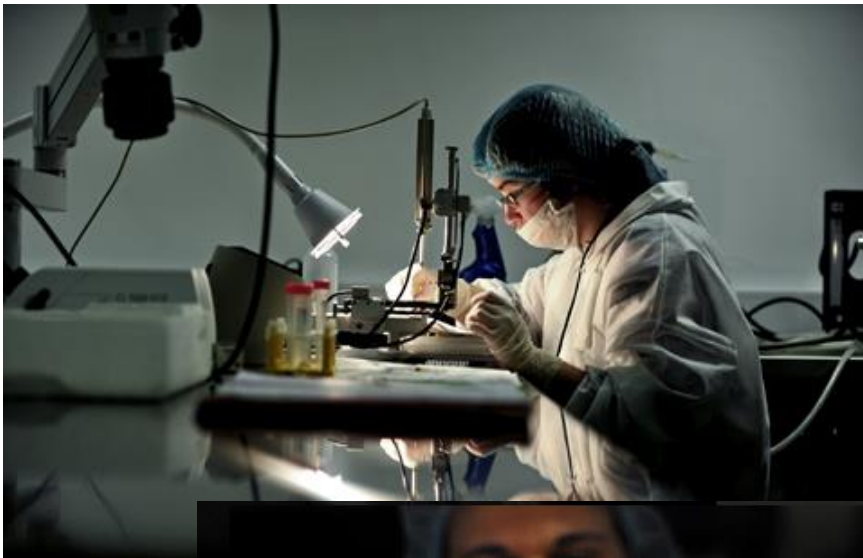
Esta pergunta é do tipo “pull-down”. No teste, os alunos terão que ‘clique’ numa janela que está à frente de cada uma das estruturas A, B e C, aparecendo a lista de pull-down onde deverá seleccionar a estrutura correcta.

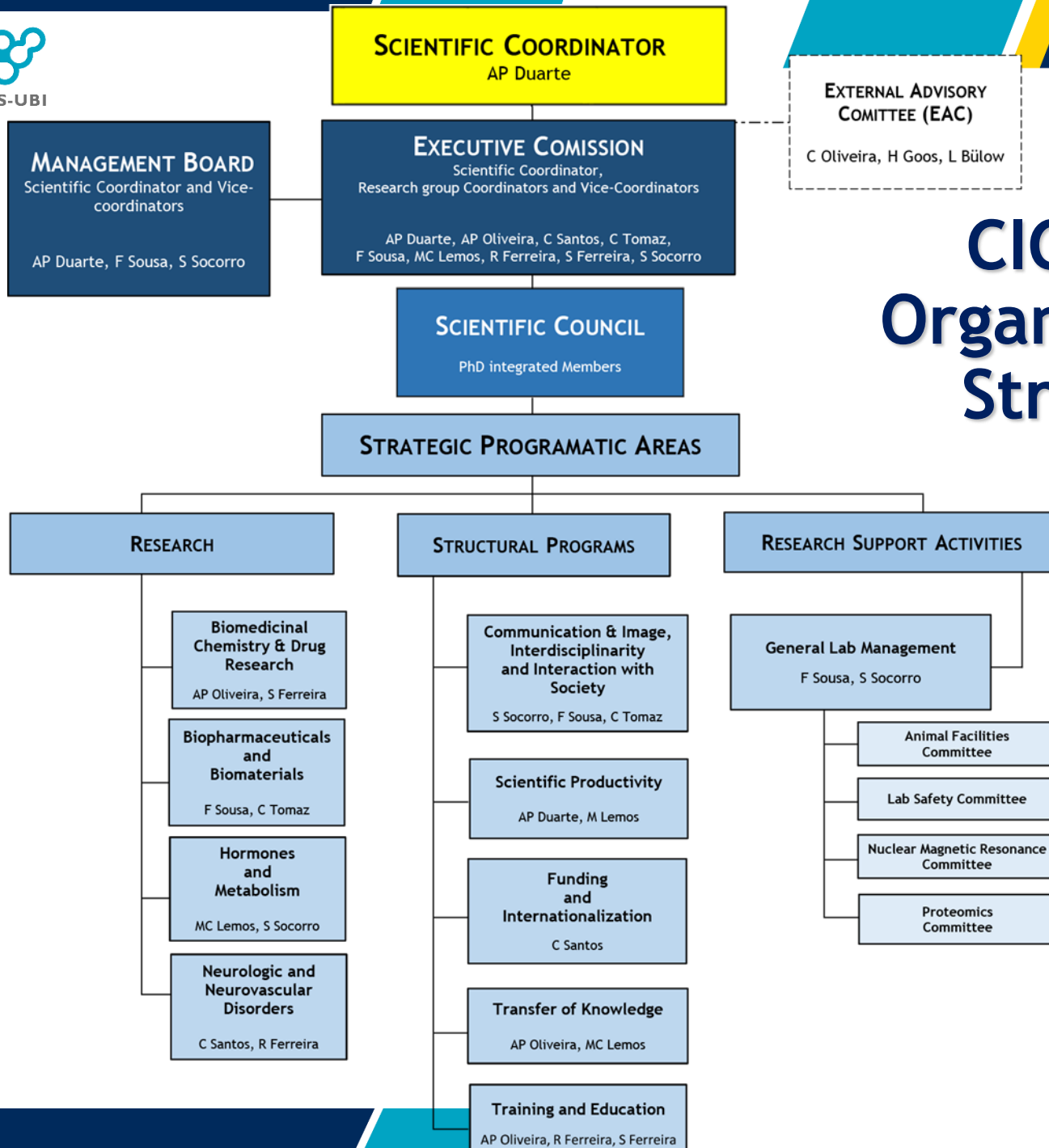
Laboratório de Competências - LaC



O LaC é uma estrutura de ensino, investigação e desenvolvimento da FCS. Articula-se com outras divisões da faculdade, nomeadamente com o Gabinete de Ensino e Metodologias de Avaliação em Ciências da Saúde (GEMA-CS) e da UBI, além de outras instituições e tem por objetivo a promoção da simulação biomédica na UBI (<http://www.ubi.pt/Entidade/LaC>).

Investigação Pré-Clínica





CICS-UBI: Organizational Structure

Facilities

Cell Culture

Fluorescence Microscopy (inverted and confocal microscopes);

Polymerase Chain Reaction (conventional thermocyclers and real time PCR)

DNA Sequencing (automatic sequencer)

Nucleic Acids Electrophoresis, Protein Electrophoresis and Western Blotting

Radioisotope (Beta-Counter)

Cytometry (flow cytometer FACScalibur, high-speed analyzer CyAn and AutoMACS cell separator)

Electrophysiology

Chromatography (FPLC system, Aktapurifier and ÄKTA Avant FPLC/HPLC, circular dichroism spectrophotometer, LC-MS, UHPLC-DAD/FD, HPLC-DAD/IR/CD and GCMS/MS)

Microbiology (orbital incubators, bioreactors)

Animal Facilities licensed by the Competent Portuguese Authority (DGAV)

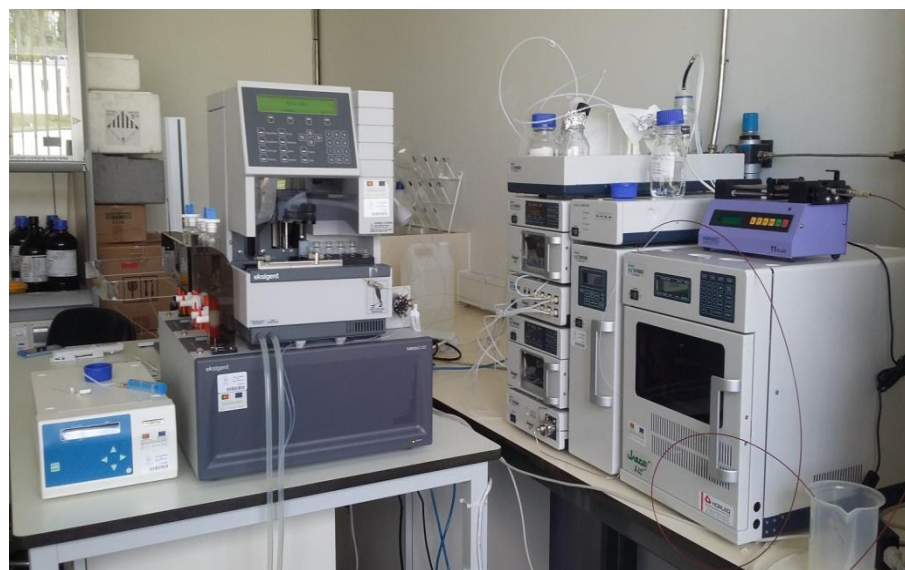
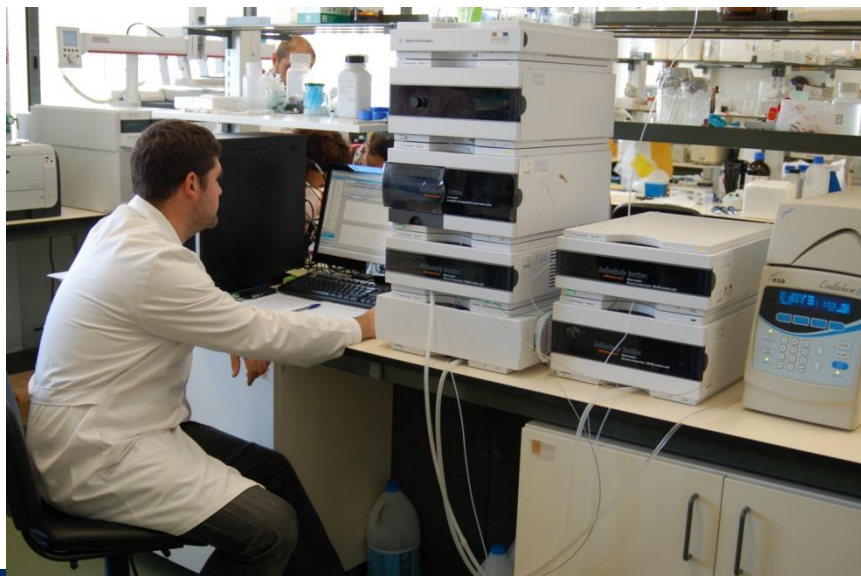
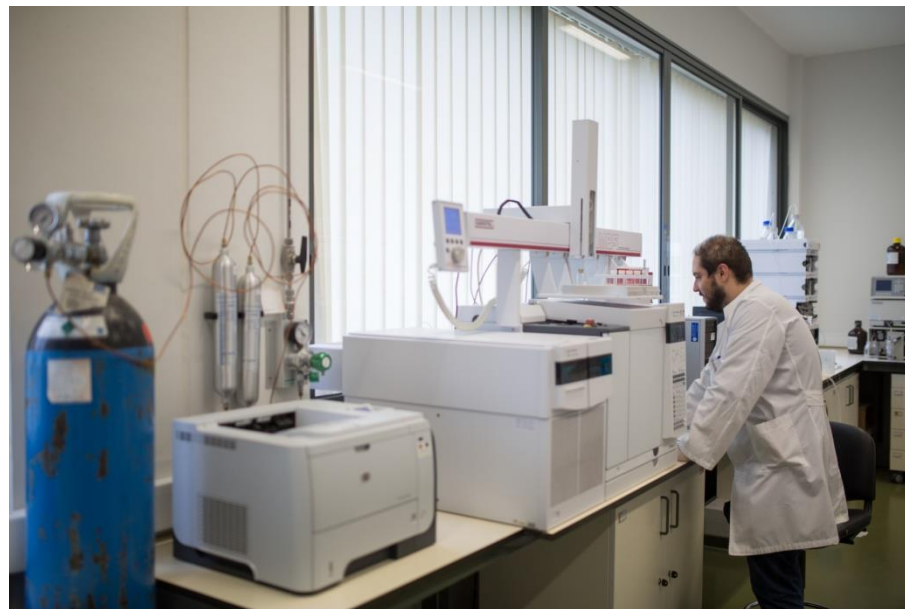
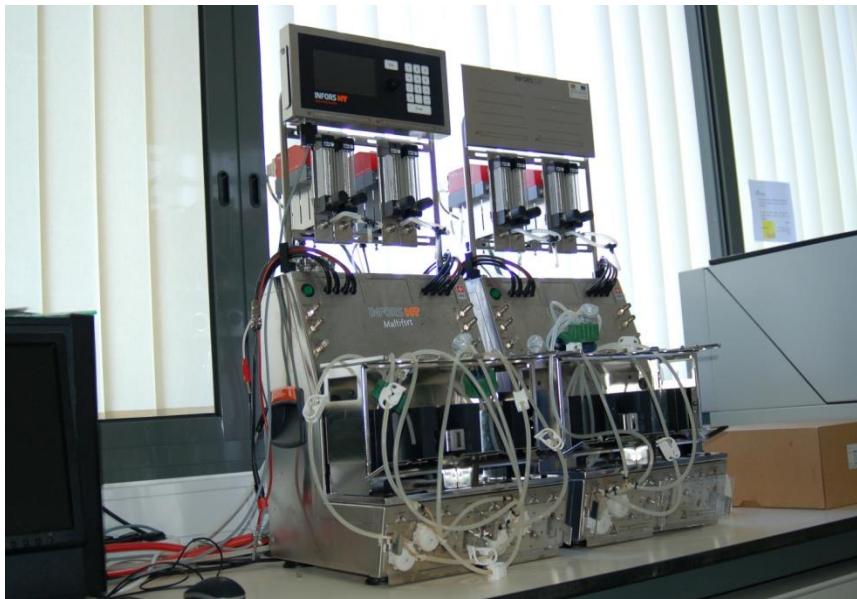
Proteomics (MALDI TOF/TOF and LC-MS/MS)

Organic Synthesis (rotary evaporators, automatic flash chromatography, microwave synthesizer)

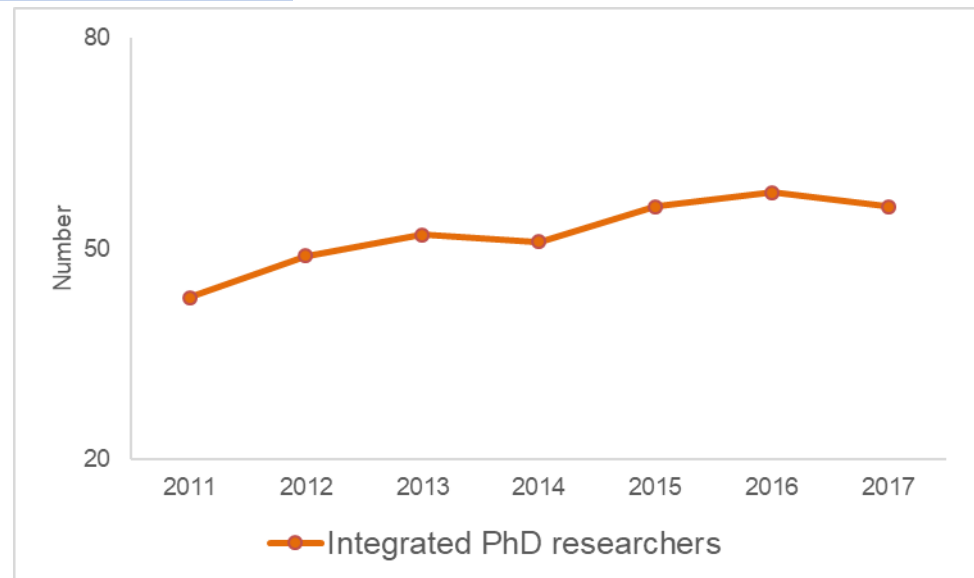
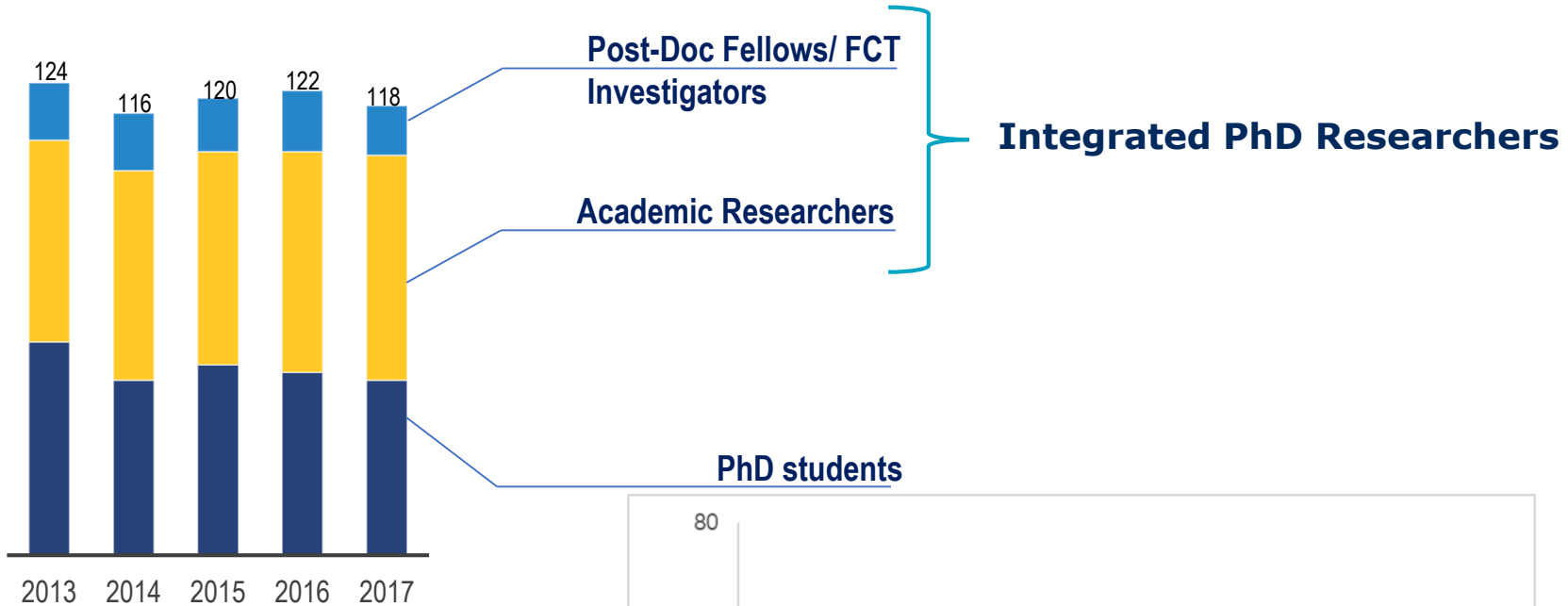
NMR (400 MHz spectrometer and 600 MHz spectrometer equipped with a CryoProbe and a SampleJet).

Microcalorimetry

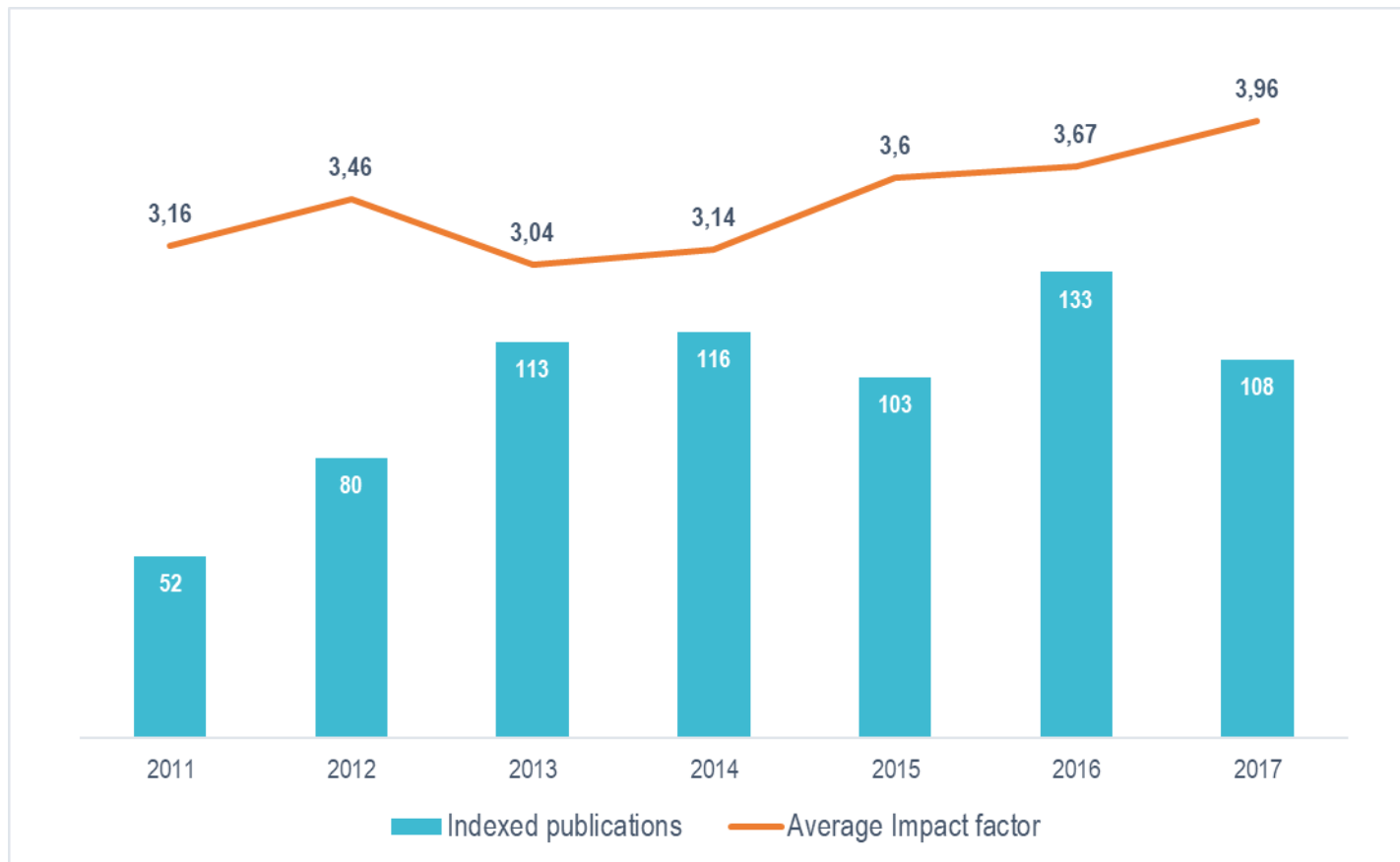




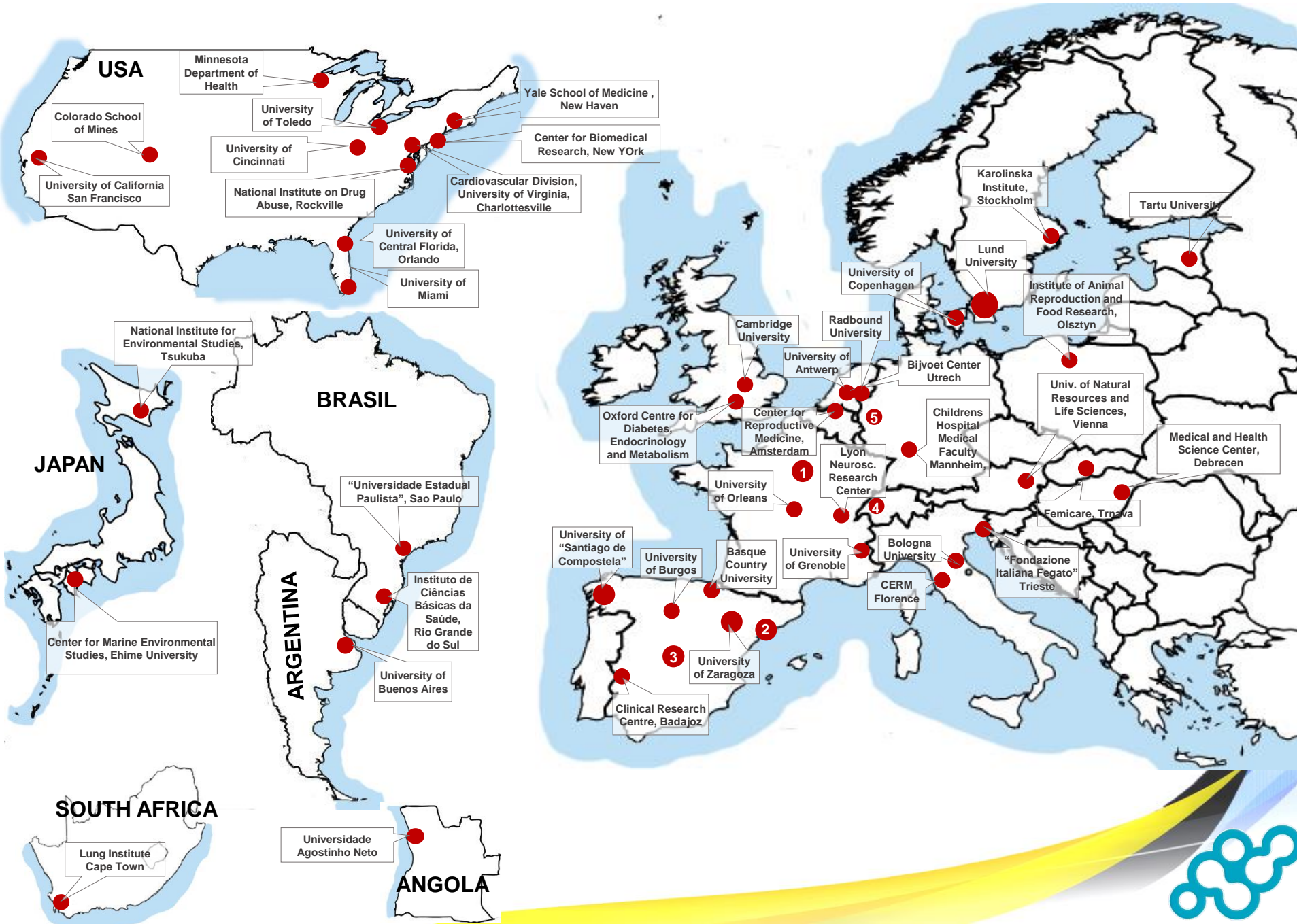
CICS-UBI in numbers...evolution



CICS-UBI in numbers...evolution



CICS-UBI in numbers...International Collaborations...



Catechol-O-methyltransferase: A protein target in Parkinson's disease

Catechol-O-methyltransferase

Catechol-O-methyltransferase (COMT, EC 2.1.1.6) is a magnesium-dependent enzyme that, in mammals, appears in two molecular forms: a soluble (**SCOMT**) and a membrane-bound (**MBCOMT**) (Bonifácio et al., *CNS Drug Rev*, 2007).

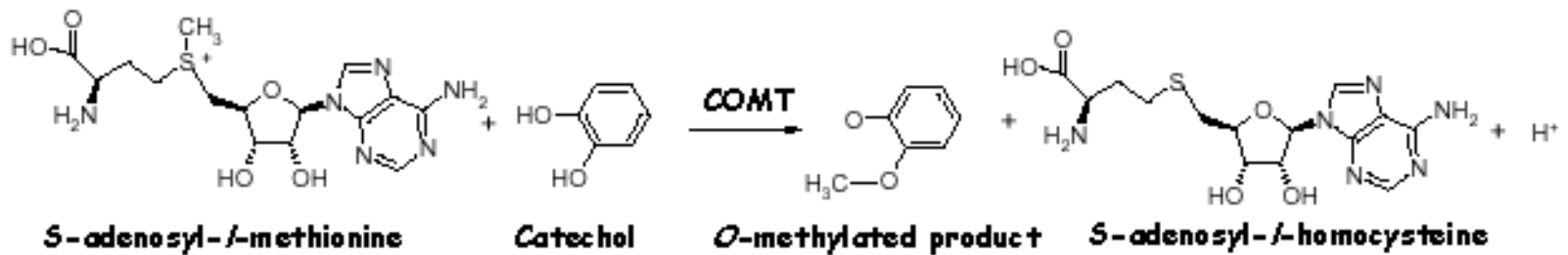


Figure 1 - Adapted from <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/mat/farma/vk/lautala/ch2.html> (8/6/2012)

MBCOMT contains 271 amino acid residues (associated with the rough endoplasmic reticulum membrane by a stretch of 21 hydrophobic amino acids) and a molecular weight of 30 kDa (Bonifácio et al., *CNS Drug Rev*, 2007).

- MBCOMT has **higher affinity but lower reaction velocity** for catecholamines when compared with SCOMT (*Reenila I. and Mannisto, P. T. Med Hypotheses, 2001*).

- The catechol metabolizing system that comprises hMBCOMT has a potential pathophysiological significance in several disorders and, in particular, in **Parkinson's disease**.

- Neurological disorder characterized by the degeneration of dopaminergic neurons, with consequent reduction in striatal dopamine levels.

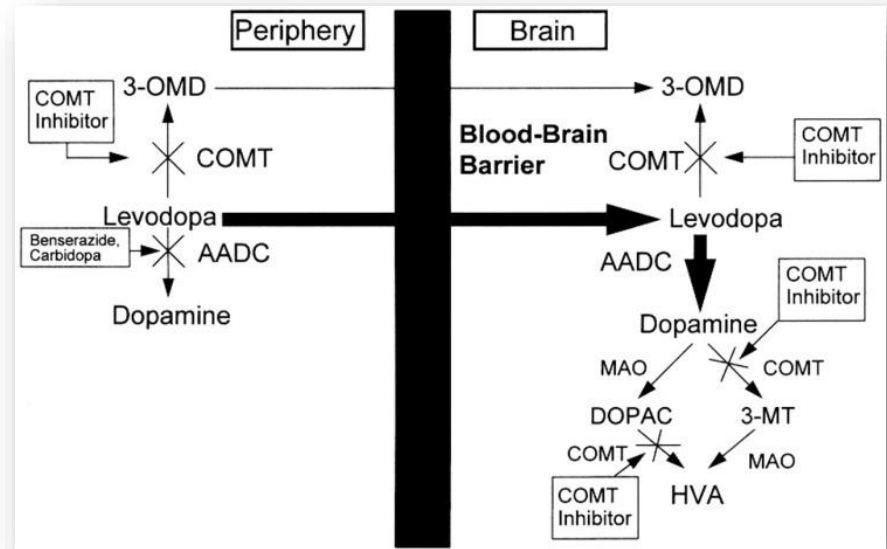


Figure 2

http://www.neurology.org/content/50/5_Suppl_5/S3/F8.large.jpg (7/6/2012)

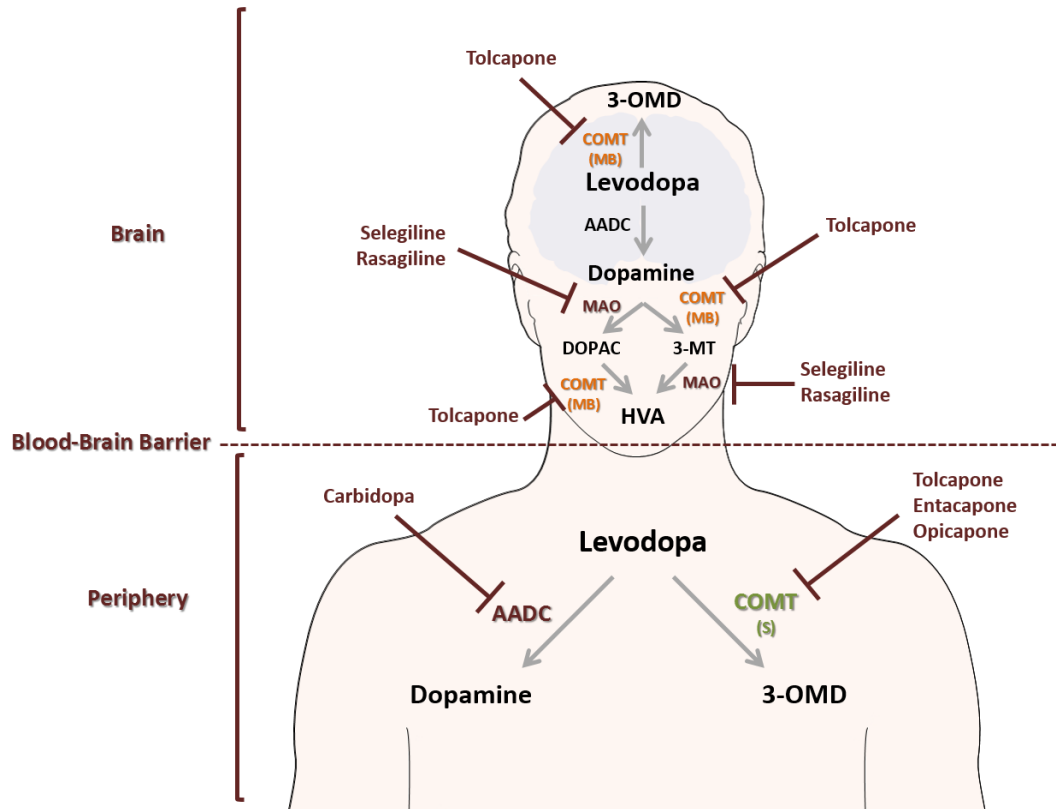


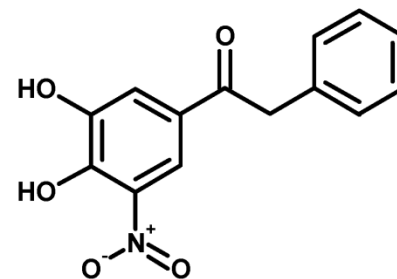
Figure 3 - Sites of action of PD drugs.

Abbreviations: 3-MT, 3-methoxytyramine; 3-OMD, 3-O-methyldopa; AADC, aromatic amino acid decarboxylase; COMT, catechol-O-methyltransferase; DOPAC, Dihydroxyphenylacetic acid; MAO, Monoamine oxidase. According to their relative distribution [Bonifácio *et al.*, 2007], in brackets are shown the most abundant COMT isoform in each location (S for SCOMT and MB for MBCOMT).

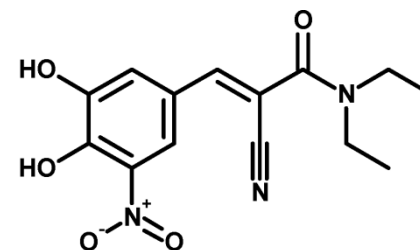
Nitrocatechol-type second generation COMT Inhibitors

- Structure-activity relationship analysis established that enhanced potency was obtained by substitution with nitro groups at a position *ortho* to a hydroxyl group of the catechol moiety.
- Although poor substrates for the enzyme, they behave competitively with respect to the catechol substrate and are uncompetitive with respect to the co-substrate SAM (Bonifácio *et al.*, *CNS Drug Rev*, 2007).

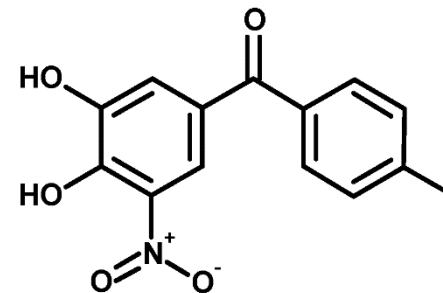
Nebicapone



Entacapone



Tolcapone



Main Goals

- Develop and optimize new recombinant systems for human MB and SCOMT production and recuperation from *Escherichia coli*, *Brevibacillus choshinensis* and *Pichia Pastoris cells* (completed).
- Purify the recombinant enzymes applying new chromatographic platforms' (completed).
- Characterize the kinetic profile of recombinant MB and SCOMT with typical substrates and inhibitors (completed).
- Study the biointeraction between SCOMT-opicapone and MBCOMT-tolcapone complexes by NMR and thermodynamic characterization using ITC (ongoing).
- Crystallize recombinant polymorphic COMT Val/Met variants in complex with tolcapone and opicapone and resolve 3-D structure (ongoing).

Biosynthesis

Appl Biochem Biotechnol (2015) 175:3840–3855
DOI 10.1007/s12010-015-1551-0

Evaluation of Mut^S and Mut⁺ *Pichia pastoris* Strains for Membrane-Bound Catechol-*O*-Methyltransferase Biosynthesis

A. Q. Pedro · D. Oppolzer · M. J. Bonifácio · C. J. Maia · J. A. Queiroz · L. A. Passarinha



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Biotechnology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbiotec



Optimization of fermentation conditions for the production of human soluble catechol-*O*-methyltransferase by *Escherichia coli* using artificial neural network

R. Silva^a, S. Ferreira^a, M.J. Bonifácio^b, J.M.L. Dias^c, J.A. Queiroz^a, L.A. Passarinha^{a,*}

^a CICS – Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

^b Bial, Departamento de Investigação e Desenvolvimento, São Mamede do Coronado, Porto, Portugal

^c REQUIMTE, Systems Biology & Engineering Group, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL), 2829-516 Caparica, Portugal

Journal of Biotechnology 156 (2011) 141–146



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Biotechnology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbiotec



A novel prokaryotic expression system for biosynthesis of recombinant human membrane-bound catechol-*O*-methyltransferase

A.Q. Pedro^a, M.J. Bonifácio^b, J.A. Queiroz^a, C.J. Maia^a, L.A. Passarinha^{a,*}

^a CICS – Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, 6201-001 Covilhã, Portugal

^b Bial – Departamento de Investigação e Desenvolvimento, 4745-457 São Mamede do Coronado, Portugal

Pedro et al. *Microb Cell Fact* (2015) 14:113
DOI 10.1186/s12934-015-0304-7



RESEARCH

Open Access



An artificial neural network for membrane-bound catechol-*O*-methyltransferase biosynthesis with *Pichia pastoris* methanol-induced cultures

Augusto Q Pedro¹, Luís M Martins¹, João M L Dias², Maria J Bonifácio³, João A Queiroz¹ and Luís A Passarinha^{1*}

Comparative study on the interaction of recombinant human soluble catechol-O-methyltransferase on some hydrophobic adsorbents

L. A. Passarinha,¹ M. J. Bonifácio² and J. A. Queiroz^{1*}

¹CICS—Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, 6201-001 Covilhã, Portugal

²Departamento de Investigação e Desenvolvimento, BIAL, 4745-457 São Mamede do Coronado, Portugal

Received 18 October 2006; accepted 14 November 2006

20

J. Sep. Sci. 2014, 37, 20–29

F. F. Correia^{1*}
F. M. Santos^{1*}
A. Q. Pedro¹
M. J. Bonifácio²
J. A. Queiroz¹
L. A. Passarinha¹

Research Article

Recovery of biological active catechol-O-methyltransferase isoforms from Q-sepharose

¹CICS-UBI-Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal
²Departamento de Investigação e Desenvolvimento, BIAL, S. Mamede do Coronado, Portugal

The development of new catechol-O-methyltransferase inhibitors has led to an improvement in the treatment of Parkinson's disease. However, despite the fact that the soluble isoform has been extensively investigated, few studies have been published concerning membrane isoform chromatographic recovery and bioactivity levels. In this work, chromatographic profiles of both catechol-O-methyltransferase isoforms were compared using continuous elution as a method to evaluate the activity levels and recovery rates. Results

Journal of Chromatography B, 879 (2011) 1704–1706



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Chromatography A, 1177 (2008) 287–296

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Short communication

Analysis of hSCOMT adsorption in bioaffinity chromatography with immobilized amino acids: The influence of pH and ionic strength

S.R. Costa^a, M.J. Bonifácio^b, J.A. Queiroz^a, L.A. Passarinha^{a,*}

^aCICS - Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, 6201-001 Covilhã, Portugal

^bBIAL - Departamento de Investigação e Desenvolvimento, São Mamede do Coronado, Portugal

A new approach on the purification of recombinant human soluble catechol-O-methyltransferase from an *Escherichia coli* extract using hydrophobic interaction chromatography

L.A. Passarinha^a, M.J. Bonifácio^b, P. Soares-da-Silva^b, J.A. Queiroz^{a,*}

^aCICS - Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, 6201-001 Covilhã, Portugal

^bDepartamento de Investigação e Desenvolvimento, BIAL, 4745-457 São Mamede do Coronado, Portugal

Available online 7 June 2007

J. Sep. Sci. 2013, 36, 1693–1702

1693

Fátima Milhano Santos¹
Augusto Quaresma Pedro¹
Rui Filipe Soares¹
Rita Martins¹
Mário João Bonifácio²
João António Queiroz¹
Luís António Passarinha¹

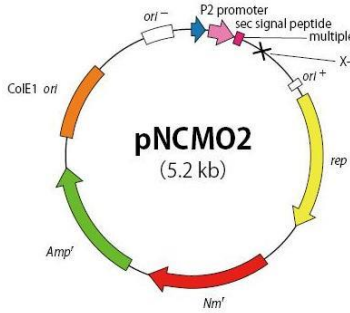
¹CICS-UBI-Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal
²Departamento de Investigação e Desenvolvimento, BIAL, S. Mamede do Coronado, Portugal

Research Article

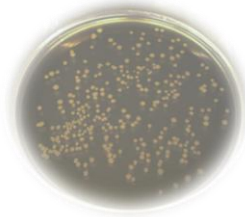
Performance of hydrophobic interaction ligands for human membrane-bound catechol-O-methyltransferase purification

Despite of membrane catechol-O-methyltransferase (MBCOMT, EC 2.1.1.6) physiological importance on catecholamines' O-methylation, no studies allowed their total isolation. Therefore, for the first time, we compare the performance of three hydrophobic adsorbents (butyl-, epoxy-, and octyl-Sepharose) in purification of recombinant human COMT (hMBCOMT) from crude *Brevibacillus choshinensis* cell lysates to develop a sustainable chro-

Methodology



Expression vector construction



***Brevibacillus choshinensis* SP3 transformation**



Recombinant hMBCOMT production



Freeze-thaw cell lysis

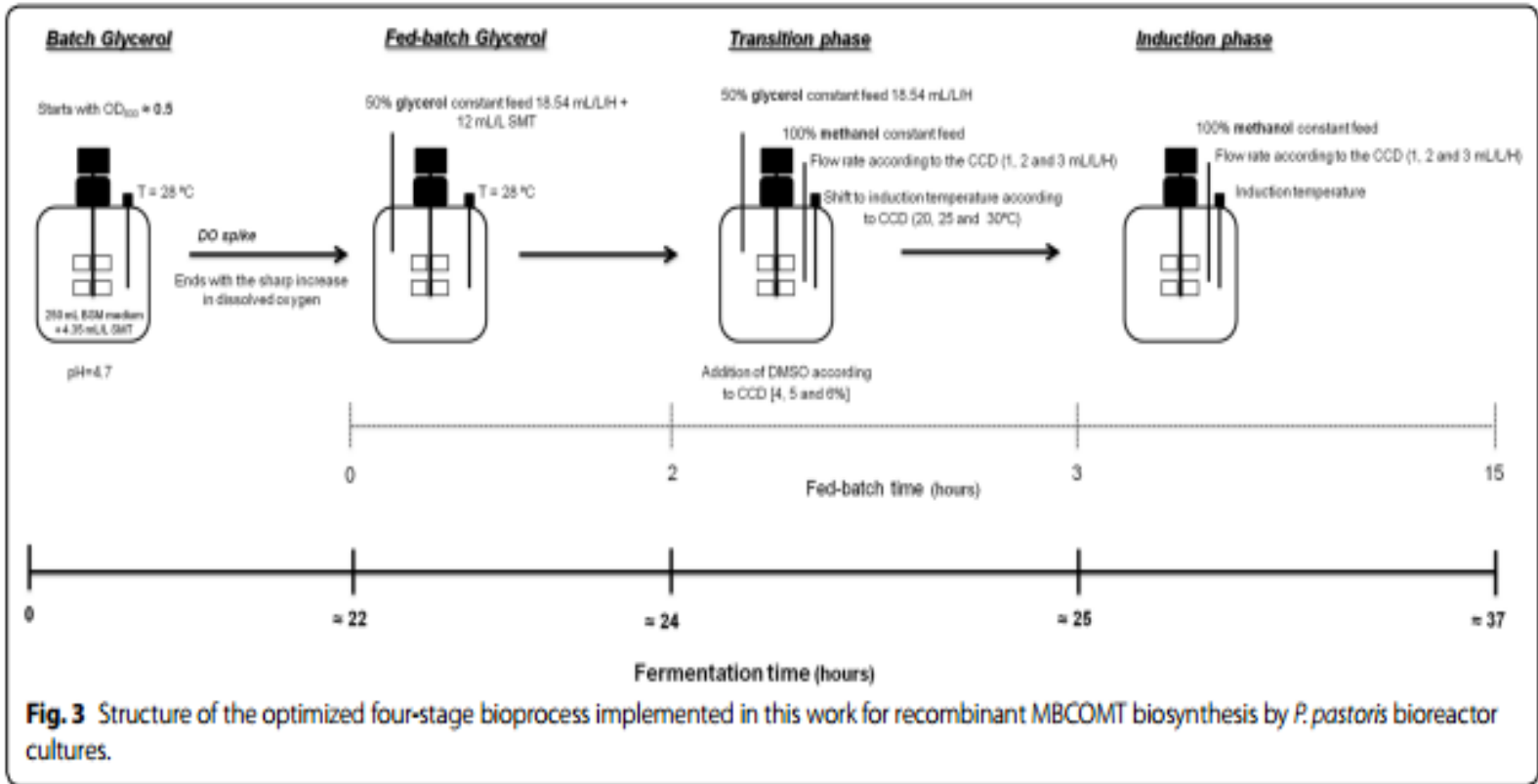


rhMBCOMT solubilization



Purification

Biosynthesis



Biosynthesis

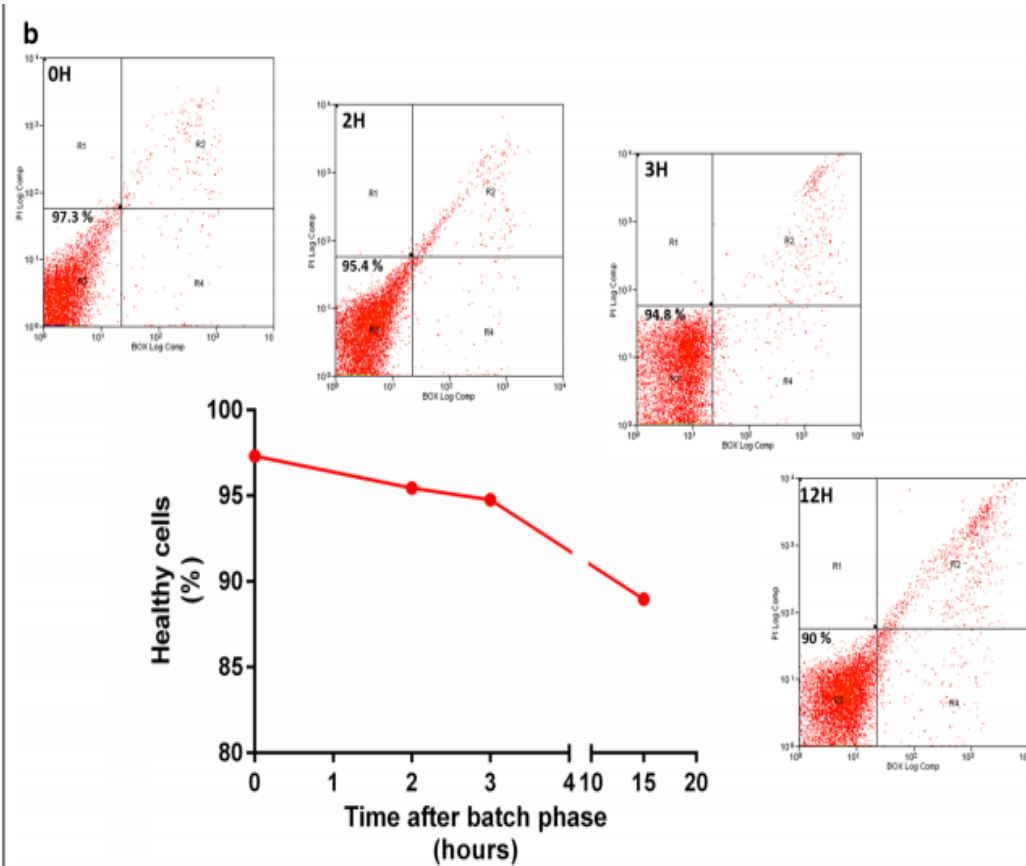


Fig. 6 Time course analysis of biomass levels, carbon sources concentrations and number of healthy *P. pastoris* cells at different stages of the optimum point estimated by the ANN model [30°C, 2.9 mL/L/h methanol constant flow-rate and 6% (v/v) DMSO]. **a** Biomass levels measured by spectrophotometric determination at 600 nm and methanol and glycerol levels measurements by HPLC with RID; (each value represents the mean of three independent samples). **b** Dot plots of green fluorescence of cells (BOX, x-axis) plotted against red fluorescence (PI, y-axis) obtained with cell samples taken at different stages of the optimum point retrieved from the ANN modelling. Three main subpopulations of cells can be distinguished corresponding to: healthy cells, no staining; cells with depolarized membranes, stained with BOX; and cells with permeabilized membranes, stained with PI. A total of 10,000 events were collected for these analysis. The variation on the percentage of healthy cells at different stages of the bio-process is depicted in the graph. Each experiment was conducted in duplicate.

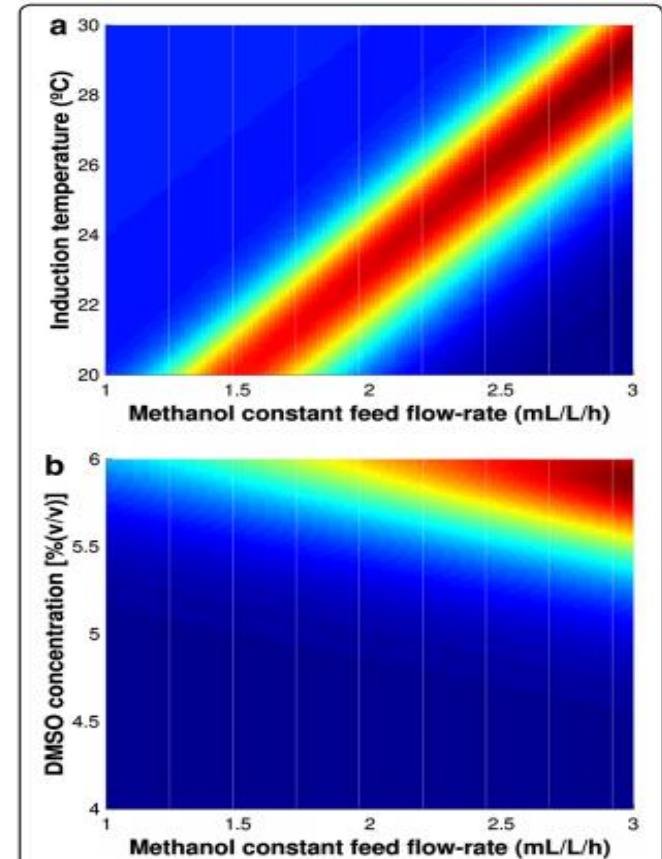


Fig. 5 Contour plots of MBCOMT specific activity as function of induction temperature, methanol constant flow-rate and DMSO concentration: **a** modeling results of MBCOMT specific activity as function of DMSO concentration and methanol constant flow-rate for the last optimization step. **b** Modeling results of MBCOMT specific activity as function of induction temperature and methanol constant flow-rate for the last optimization step.

Isolation

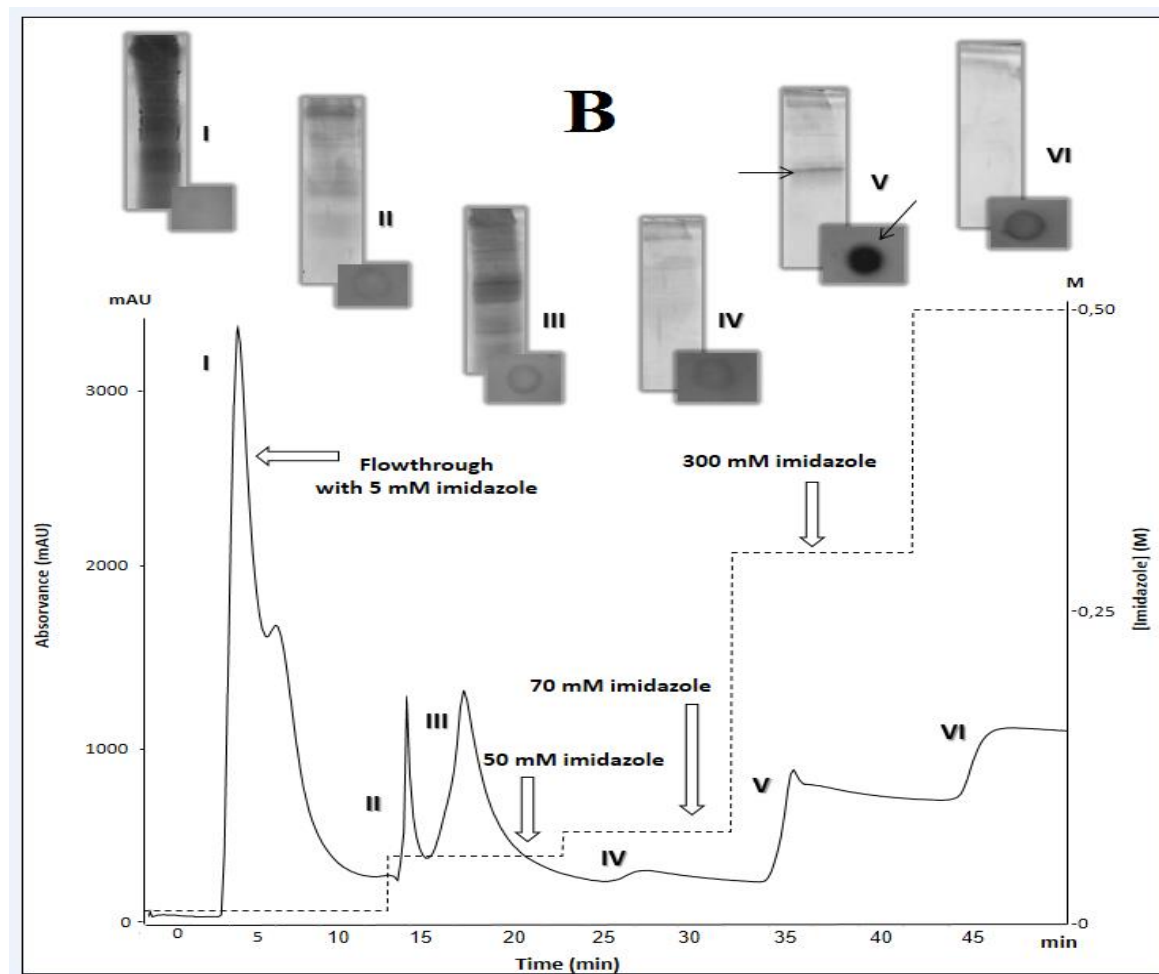
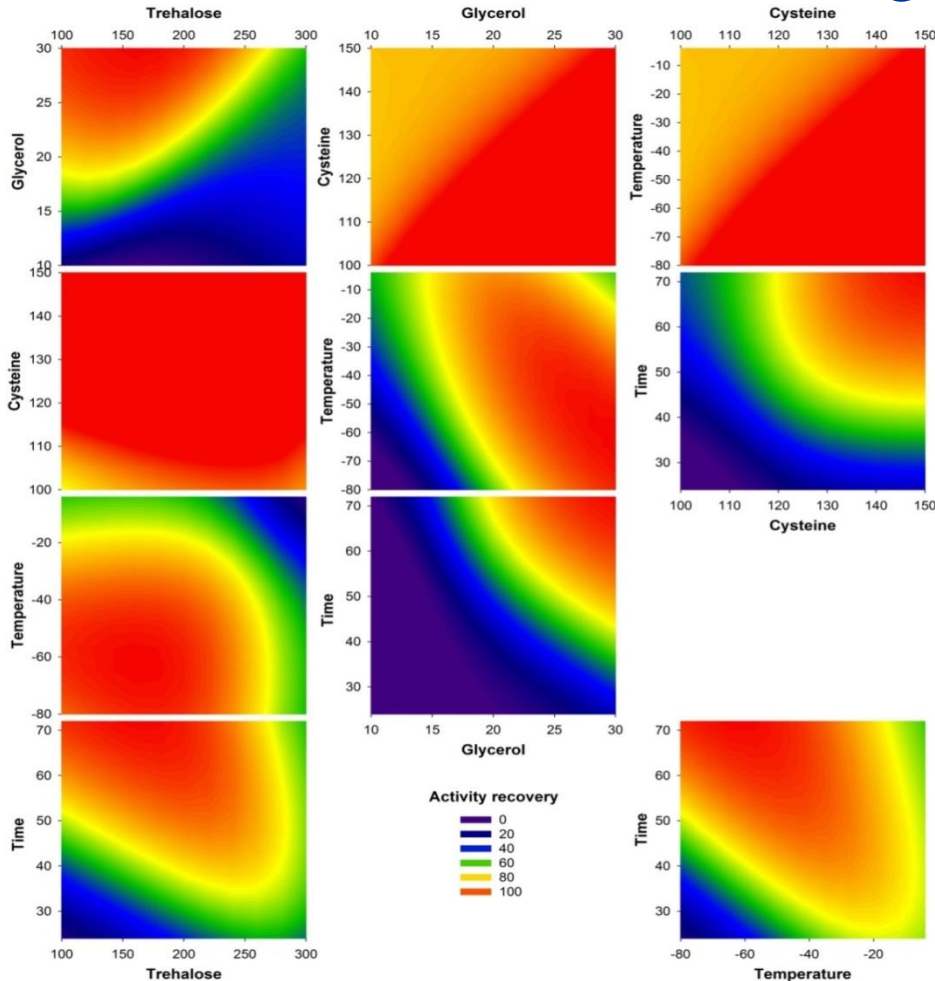


Figure 4 - Chromatographic profiles of the different strategies evaluated for the recombinant human SCOMT_His₆ purification from *P. pastoris* lysates on a HisTrap FF crude resin.

Stabilization



The model estimation for maximum activity recovery was 219.24% under the optimal conditions

- 160 mM trehalose
- 30% (v/v) glycerol
- 150 mM cysteine
- (-) 64,5 °C
- 72 hours

Figure 5 – Contour plots of MBCOMT specific activity (nmol/h/mg), as a function of the stabilizers concentration, storage temperature and storage time.

Identification

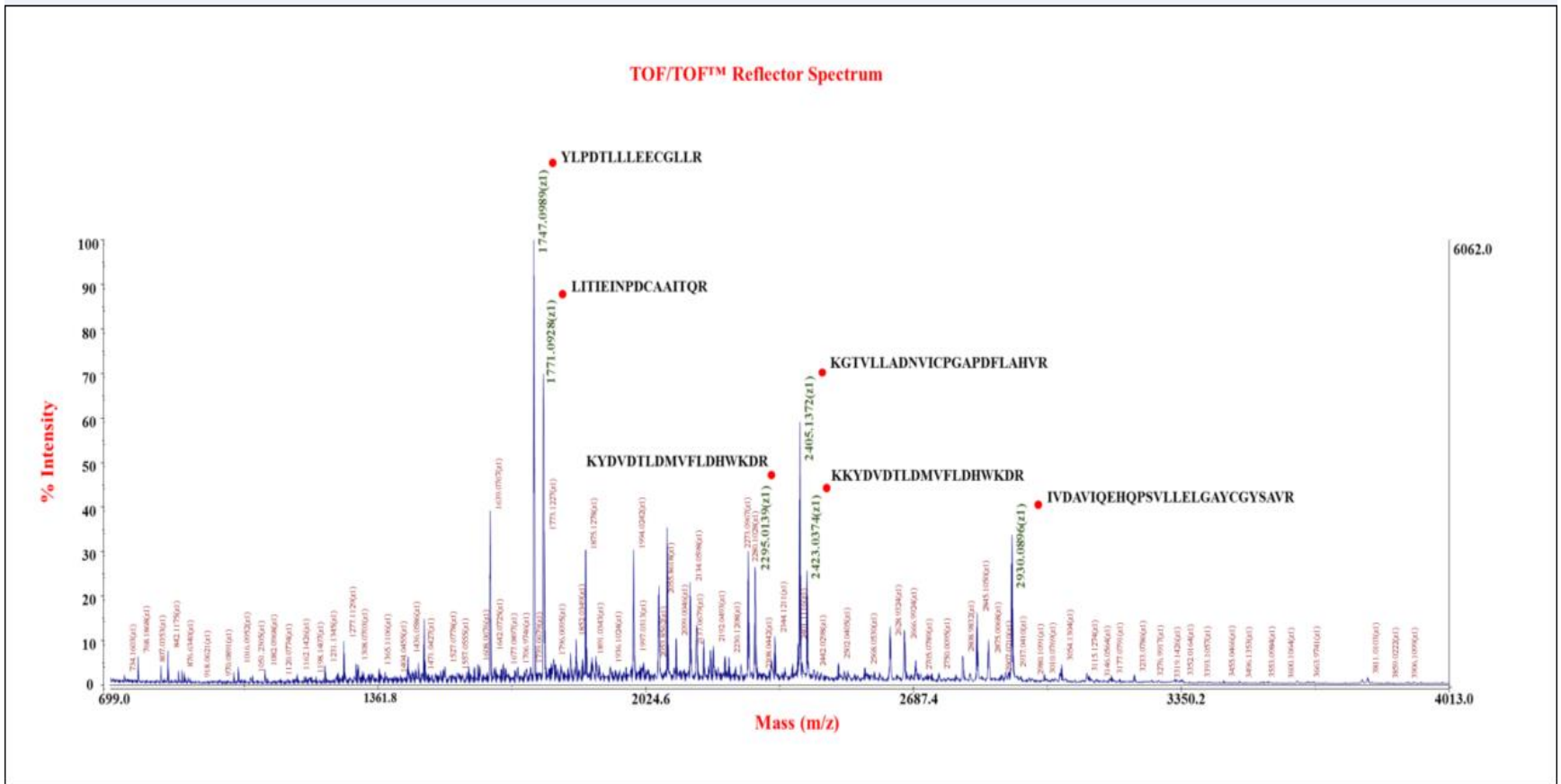


Figure 6 - Mass spectrometry spectrum obtained from recombinant sCOMT tryptic peptides analysis by MALDI-TOF/TOF. The peaks corresponding to sCOMT tryptic peptides that allowed its identification are highlighted in bold, as well as the respective identified sequences.

Kinetics Characterization

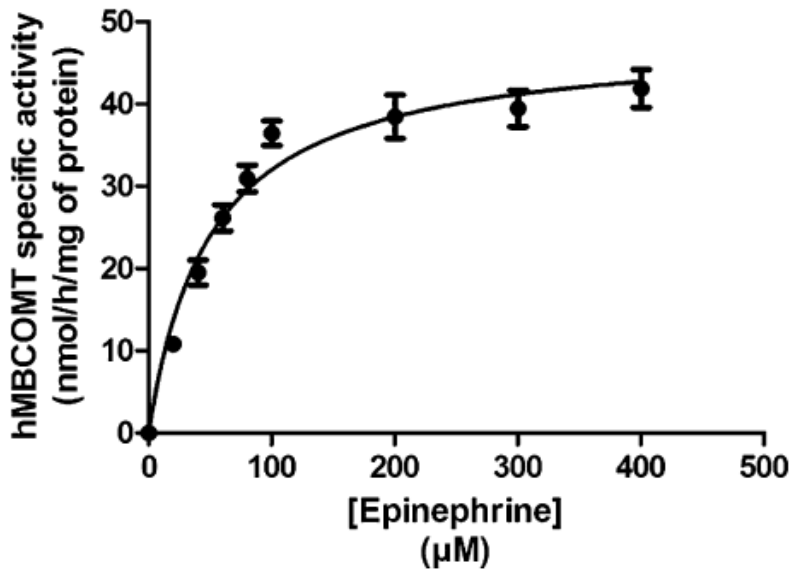


Figure 7 - Saturation curve of rhMBCOMT after solubilization of the membrane fraction with Triton X-100 1% (v/v).

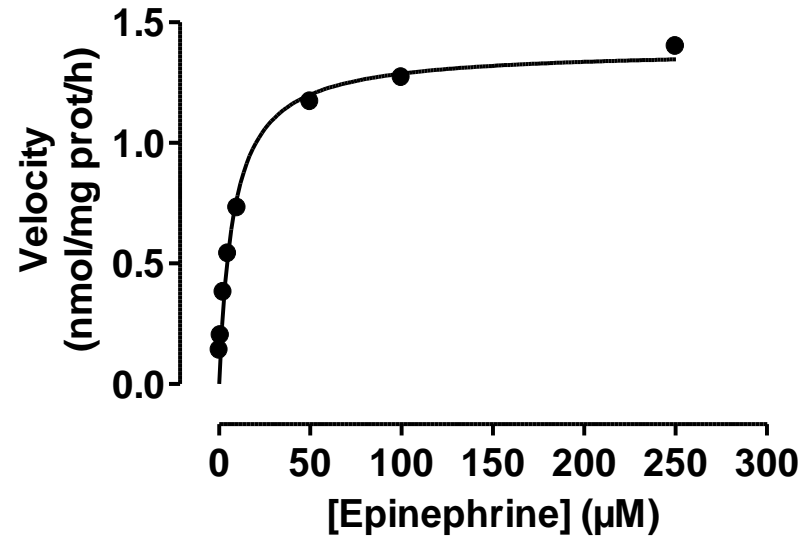
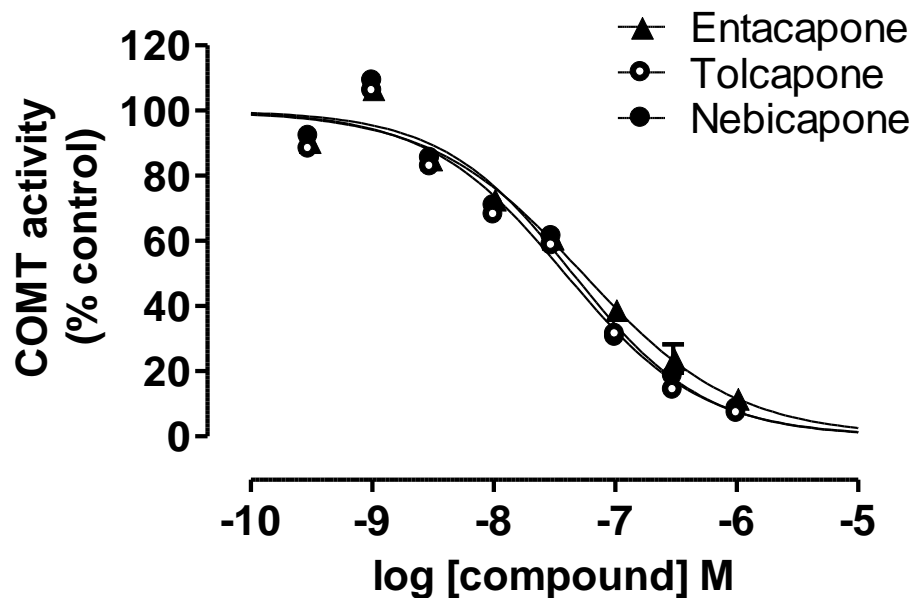


Figure 8 - Saturation curve of rhMBCOMT after solubilization of the membrane fraction without detergent.

COMT Inhibition



Compound	IC ₅₀ (nM)
Entacapone	54 (30; 50)
Tolcapone	39 (30; 50)
Nebicapone	45 (35; 57)

Figure 9 – Concentration-dependent inhibition curves of rhMBCOMT solubilized with detergent in the presence of three nitrocatechol inhibitors.

SCOMT inhibition

Table 1 – IC₅₀ values for inhibition by 3,5-DNC and Entacapone of SCOMT activity purified from IMAC obtained in this work and comparison with previous values reported in the literature. Values are means with 95% confidence values (n = 3).

Sample	Compound	IC ₅₀ (nM)	Reference
Recombinant purified SCOMT	3,5-DNC	13.26 (10.70 to 16.44)	This work
SCOMT from rat brain	3,5-DNC	28 (15 to 52)	[22]
SCOMT from rat liver		356 (156 to 811)	
Recombinant purified SCOMT	Entacapone	4.224 (2.949 to 6.050)	This work
SCOMT isolated from rat duodenum	Entacapone	10.0	[39]
SCOMT isolated from rat erythrocytes		20.0	
SCOMT isolated from rat liver		160.0	

Where we stand?

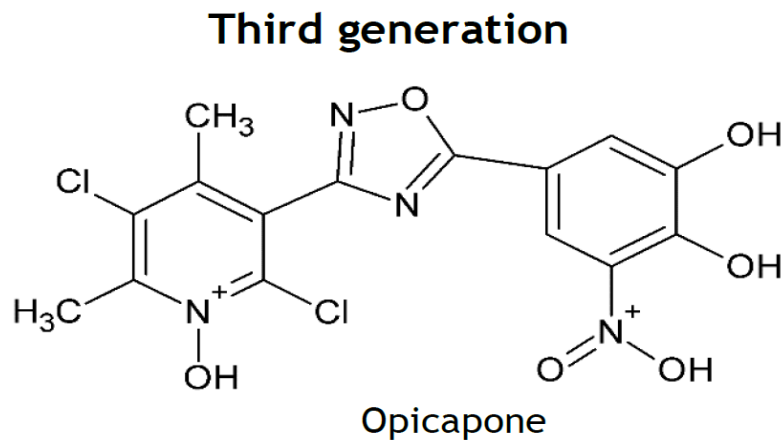


Figure 10 - Chemical structure of third generation of catechol-*O*-methyltransferase inhibitors Opicapone.

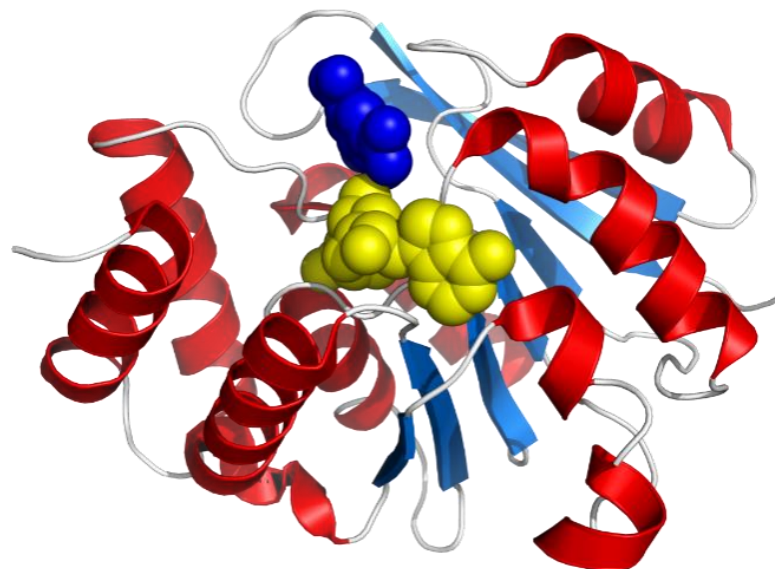


Figure 11 - Structure of human COMT in complex with 3,5-dinitrocatechol (dark blue) and S-adenosyl methionine (yellow). From PDB.

Where we stand?

european journal of neurology

the official journal of the european academy of neurology



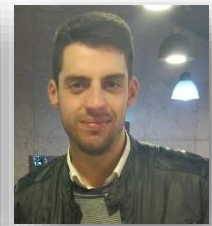
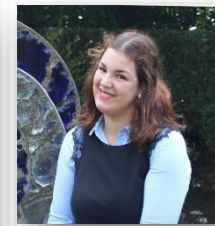
ORIGINAL ARTICLE

Effect of opicapone on levodopa pharmacokinetics, catechol-O-methyltransferase activity and motor fluctuations in patients with Parkinson's disease

J. J. Ferreira^a, J.-F. Rocha^b, A. Falcão^c, A. Santos^b, R. Pinto^{b,d}, T. Nunes^b and P. Soares-da-Silva^{b,d,e}

^aNeurological Clinical Research Unit, Institute of Molecular Medicine, Lisbon; ^bDepartment of Research and Development, BIAL – Portela & C^a SA, S. Mamede do Coronado; ^cDepartment of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University Coimbra, Coimbra; ^dDepartment of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, University Porto, Porto; and ^eMedInUP – Center for Drug Discovery and Innovative Medicines, University of Porto, Porto, Portugal

- MSc and PhD students collaborating in recombinant isoforms of COMT studies since 2008.
- This work was partially supported by Health Sciences Research Centre (CICS), Covilhã, Portugal.
- This work is supported by FEDER funds through the POCI - COMPETE 2020 - Operational Programme Competitiveness and Internationalisation in Axis I - Strengthening research, technological development and innovation (Project No. 007491) and National Funds by FCT - Foundation for Science and Technology (Project UID/Multi /00709).



Thank you for your attention!

Do ensino em auto-aprendizagem até à investigação pré-clínica: UBI-FCS um case study

Luís António Paulino Passarinha^{a,b,c}

^aCICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, 6201-506 Covilhã, Portugal

^bUCIBIO@REQUINTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

^cLaboratório de Fármaco-Toxicologia-UBIMedical, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal