

MSc candidates from Biochemistry, Biology, Biotechnology, Veterinary or equivalent.

MSc 1 : Identification of orthologous of the Outer Surface Protein (OSP) family in the piroplasm *Babesia bigemina* and *B. ovis*

The main objective of this project is the identification in *Babesia bigemina* and *B. ovis*, the OspA, OspB and OspC a family of proteins, previously described in *Borrelia burgdorferi*. Numerous studies have shown that *B. burgdorferi* expresses specific OSPs in distinct phases of its life cycle and of the infection.

A receptor for OspA was already described in the tick *Ixodes scapularis* and recently, an ortholog of the receptor of Osp A was identified in *Rhipicephalus annulatus* infected with *B. bigemina* suggesting that the piroplasm uses similar proteins to invade the vector. In that study, the Tick Receptor for OspA (TROSPA) was showed to be upregulated in the ticks after infection with the *B. bigemina* which points to the involvement of this receptor on the pathogen adherence to tick cells.

In this work the main objectives are:

- Extraction of DNA from *Babesia bigemina* and *B. ovis*
- Identification of sequences described in databases for primer design
- Isolate genes corresponding to the OSP family in *Babesia bigemina* and *B. ovis*
- Analyses of obtained gene sequence and comparison with those already available

This work will be mainly conducted at the

- Biomolecular Diagnostic Laboratory – ITQB (Abel Oliva)
- UEI Parasitologia Médica - Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Ana Domingos)..

MSc 2: Development of a nested micro and minisatellite marker system for typing of *Babesia bovis* field samples.

Introduction

A micro and minisatellite marker system based on a single direct PCR amplification step developed by our group has been proved useful for the typing of *Babesia bovis* reference strains. However, this system cannot be applied for the typing of field samples as the parasitemia of animals in the field that are usually chronically infected with *B. bovis* escapes direct PCR detection. To allow the typing of *Babesia bovis* isolated from field animals using the available micro and minisatellite marker system a secondary amplification primers will be designed and tested to faithfully amplify markers by nested PCR. The nested PCR-based marker system will be used to type *B. bovis* isolates originating from different regions of Portugal to compare them with respect of polymorphism and population genetic structure.

OE1: A highly sensitive micro and minisatellite multilocus marker system based on nested PCR amplification will be established which will allow the typification of field isolates. To this end outer amplification primers for each individual molecular marker of the system will be designed and verified with respect to faithful amplification of *B. bovis* isolates from different geographic regions. It is expected that the system will have a significant higher sensitivity of detection allowing the typing of field isolates.

OE2: *B. bovis*-field isolates from chronically infected animals from two different endemic regions of Portugal will be compared with the nested PCR-based typing system. In parallel, also *B. bovis*-field isolates from acute infections will be typed. The multilocus genotype of each parasite isolate will be assessed and a phenogram constructed. This will allow to address the following questions: (i) is there a differential selection of genotypes of *B. bovis* isolated from acute infections with respect to those isolated from chronically infected animals. (ii) which is the population genetic structure between isolates of the two geographic regions of Portugal and/or within each of these regions.

Most important: a minimum of 30 *B. bovis* samples

10 *B. bovis* isolates from acute infected bovines originating from either region A or from B

10 *B. bovis* isolates from chronically infected bovines of region A

10 *B. bovis* isolates from chronically infected bovines of region B

For testing the typing system 4 *B. bovis* samples from geographic origin of different continents (reference strains) to test out the nested PCR secondary primers. The primers to amplify individual markers are available from INTA/Argentina.

Supervision: Leonard Schnittger (INTA/Argentina); Abel Oliva (ITQB-UNL)

MSc 3: Neutralization of cysteine-proteases in *in vitro* culture of *Babesia ovis*

Babesia ovis is a tick-transmitted hemoprotozoan parasite of sheep and goats, of which little is known. With the aim of developing improved strategies for its control, this work will investigate if cysteine proteases of this parasite have a relevant functional role, as has been described for other pathogenic protozoa. A biological impact of cysteine proteases in infection of *B. ovis* will be measured by two parameters: (i) *in vitro* growth impairment by cysteine protease-specific inhibitors and (ii) neutralization of invasion of erythrocytes by antibodies against a representative member of the cysteine proteases of the parasite.

In vitro cultures of *B. ovis* merozoites will be produced in ovine erythrocytes and evaluation of infection will be done by measuring the percentage of infected erythrocytes after different time points, by Giemsa staining of blood smears and software supported microscopy imaging (ImagePro). The cultures will be prepared in 24 wells plates in cell incubator at 37°C, with specific gas mixture atmosphere in sterile environment. The experiments with the inhibitors will be carried out in triplicate, in 96 wells plates, and the different drugs will be added in different concentrations to the culture media and the %IE will be evaluated each time the media is renewed. Besides the Giemsa procedures, a nucleus dye-labeling technique will be used towards identification of parasite DNA in the infected red blood cells. The cultured parasite will be challenged by anti-malaria tested drugs related to the growth inhibition, like ciano-pirimidines (1) and peptidil vinyl sulfonas (2), some of which have been proved to be effective in very low concentrations and affect *Plasmodium falciparum* falcipain-2 and falcipain-3 activity. On the other hand, the presence of neutralization sensitive B-cell epitopes will be analyzed on a newly identified cysteine protease of *B. ovis*, ovipain-2. To this end, murine antibodies against a recombinant form of this protein will be incubated with merozoites, followed by evaluation of their erythrocyte-invading capacity, as described above.

This investigation will provide relevant information on the potential of cysteine proteases as targets of therapeutic interventions against *B. ovis*.

1. Coterón JM, Catterick D, Castro J, Chaparro MJ, Díaz B, Fernández E et al. (2010) Falcipain inhibitors: optimization studies of the 2-pyrimidinecarbonitrile lead series. *J. Med. Chem.* 53. 6129-52.

2. Shenai BR, Lee BJ, Alvarez-Hernandez A, Chong PY, Emal CD, Neitz RJ, Roush WR, Rosenthal PJ. Structure-activity relationships for inhibition of cysteine protease activity and development of *Plasmodium falciparum* by peptidyl vinyl sulfones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Jan;47(1):154-60.

Supervisor: Abel Oliva (ITQB-UNL) - Monica Florin-Christensen (INTA-Argentina)

Para: Eng. electrónico/Eng. Instrumentação/Eng Físico ou afins

MSc4: Espectrometria de impedância aplicada à caracterização de células parasitadas numa plataforma de microfluídica

Orientadores: Doutor Abel González Oliva – Biomolecular Diagnostic Laboratory – ITQB-UNL;
Prof. Raul Martins - Sistemas Biomédicos e Biossinais IST.

3. Plano de trabalho

O trabalho está focado na implementação da componente electrónica num dispositivo de diagnóstico molecular para caracterização de células parasitadas. Através da integração de eléctrodos em chips de microfluídica (escala micrométrica) pretende-se otimizar a utilização de Espectroscopia de Impedância para discriminação analítica de células individualizadas, não aderentes, num fluxo contínuo pelo microcanal. As tarefas a desenvolver são:

- Design e modelização de eléctrodos a ser depositados no microcanal e da interface electrónica (utilização de geradores de frequência, desenho de circuito pré-amplificação sinal, construção, implementação e optimização da aquisição do sinal). Aquisição e processamento de sinal utilizando software LabVIEW e interface da National Instruments
- Optimização da medição de impedância para amostras biológicas com recurso a mudanças de frequência, potenciais e condutividade do meio, adaptado ao objecto a medir (em colaboração com outros membros do projecto)
- Caracterização de micropartículas e células em contínuo utilizando chip de microfluídica.
- Contribuição para publicações científicas em revistas internacionais

4. Duração aproximada:

6 meses de trabalho experimental – 3 meses de trabalho com literatura e escrita da tese.

5. Local de Realização:

Biomolecular Diagnostic Laboratory – ITQB-UNL Av. da Republica EAN 2780 -157 Oeiras

6. Número de alunos por projecto: 1

7. Interesse científico: A técnica de **espectroscopia de impedância** têm vindo a ganhar importância nos últimos anos, nomeadamente para aplicações biológicas, permitindo a interpretação de mudanças morfológicas e metabólicas em células, associadas a integridade de membrana ou mudanças no conteúdo celular. A medição pode ser feita em contínuo com recurso a canais de microfluídica, permitindo caracterizar amostras sem necessidade de marcação ou de manipulações complexas. O grupo tem explorado esta técnica no passado e encontra-se neste a momentos a desenvolver novos chips para novas aplicações.

8. Publicações do grupo nesta área científica

Label-free detection of Babesia bovis infected red blood cells using impedance spectroscopy on a microfabricated flow cytometer.

Claudia Kuttel ; Elisabete Nascimento; Nicolas Demierre; Tiago Silva.; Thomas Braschler;

Phillippe Renaud and Abel G Oliva. (2007) *Acta Tropica* 102 (2007) 63–68

Dielectrophoretic sorting on a microfabricated flow cytometer: label free separation of *Babesia bovis* infected erythrocytes. Elisabete M. Nascimento, Nuno Nogueira, Tiago Silva, Thomas Braschler, Nicolas Demierre, Phillippe Renaud, Abel G. Oliva. *Bioelectrochemistry* Volume 73, (2008) Issue 2, Pages 123-128

Continuous separation of cells by balanced dielectrophoretic forces at multiple frequencies T. Braschler, N. Demierre, E. Nascimento, A. G. Oliva, and P. Renaud, *Lab Chip*, (2008) 8, 280 - 286, DOI: 10.1039/b710303d.

MSc5 Caracterização e optimização de estrutura microfluídica para sensor híbrido de eritrócitos

Área de trabalho: Microfluidica

Breve descrição do tema:

O projecto baseia-se na caracterização e optimização do design de um chip de microfluídica utilizado na medição de uma amostra de sangue em tempo real, com um sistema que integra eléctrodos e guias de ondas junto a um microcanal, que permite a identificação e caracterização fisiológica de células não aderentes. Este sistema híbrido em desenvolvimento permite inserir células vivas no microcanal, para realizar a medição em tempo real de impedância e de características ópticas desta. Diferentes configurações do microcanal central e estruturas acessórias estão em desenvolvimento e devem ser modelizadas e caracterizadas. O trabalho a desenvolver visa a caracterização e optimização do sistema de microfluídica a implementar no sensor híbrido (óptico e impedimétrico) para monitorizar células viáveis, não-aderentes (eritrócitos ovinos)

Objectivos a atingir durante o trabalho (Estudo teórico, Simulação, protótipo de equipamento, melhoria de um processo ou equipamento, etc)

Estudo teórico, optimização do design e simulação de ensaios com estruturas de microfluídica associadas ao chip

Enquadramento na Engenharia Biomédica / Biofísica (explicar qual a importância do trabalho para a Medicina ou a Biologia ou a ligação com essas áreas)

Este projecto aponta ao desenvolvimento de um sistema híbrido electro-óptico e com microfluídica para caracterizar células individuais numa forma não invasiva. A utilização de sistemas de monitorização e diagnóstico explorando células vivas contribui como uma nova ferramenta para aplicações clínicas, em tempo real e sem a necessidade de marcação ou de utilização de estratégias laboratoriais mais sofisticadas.

Plano de trabalho resumido (com uma estrutura do que é esperado do aluno ao longo dos cinco meses de trabalho)

- Revisão bibliográfica e introdução no sistema instrumental
- Caracterização do sistema microfluídico presente
- Integração dos sistemas de monitorização ópticos e de eléctrodos
- Optimização e construção do novo design do chip
- Testes laboratoriais

Orientadores

a) Dr. Abel González Oliva, Laboratório Diagnóstico Biomolecular, ITQB-UNL

b) -Prof. Hugo Águas FCT-UNL, CENIMAT

Local de realização do trabalho

a) Laboratório Diagnóstico Biomolecular, ITQB-UNL

Av da Republica (EAN), 2780-157 Oeiras

b) FCT-UNL – CENIMAT, Campus de Caparica 2829-516 Caparica, Portugal