

## **Plano de trabalhos para tese de Mestrado 2011/2012**

**Tema:** Novos modelos celulares humanos do sistema nervoso central para avaliação de vectores para terapia génica

**Orientadores:** Doutora Paula Marques Alves, Doutora Catarina Brito

**Local:** Unidade de Tecnologia de Células Animais, ITQB-UNL/IBET

**Web page do grupo:** <http://tca.itqb.unl.pt>

**Duração da componente experimental:** 1 ano lectivo

### **Enquadramento**

A prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, estão ainda longe de se tornarem realidade. Embora as estratégias farmacológicas convencionais se tenham revelado pouco eficazes, resultados preliminares indicam que a terapia génica poderá ter grande potencial. Os vectores adenovirais baseados no serotipo canino 2 (CAV-2) transduzem preferencialmente neurónios, tendo o potencial de ser transportados a longa distância no cérebro via transporte axonal. A expressão episomal a longo prazo permite a uma entrega eficiente do material genético especificamente em neurónios (Bru *et. al.* 2010). A aplicação da terapia génica está, no entanto, dependente da resolução de uma série de questões ainda em aberto - em particular, a necessidade de avaliar a sua exequibilidade, eficácia e segurança. Conhecer as perturbações provocadas na biologia da célula-alvo (ou seja, os mecanismos de infecção, a interacção com o vector, as alterações a nível transcricional) é indispensável para prever possíveis efeitos adversos.

O projecto europeu BrainCAV ([www.braincav.eu](http://www.braincav.eu)), no qual este plano de trabalhos de mestrado está integrado, propõe-se a avaliar o potencial de vectores CAV-2 para melhor compreender, e possivelmente tratar, a doença de Parkinson. Tendo em vista a potencial aplicação dos vectores CAV-2 em ensaios clínicos, será necessário, numa primeira fase do projecto, avaliar estes efeitos em células do cérebro. Dada a complexidade do sistema nervoso central, nomeadamente a importância da interacção neurónio-astrocyto, é difícil encontrar modelos celulares adequados. Adicionalmente, a utilização *in vitro* de células de origem humana, cujo comportamento será mais facilmente extrapolado para a situação *in vivo*, é limitada. Alternativas possíveis passam pela utilização de neurónios e células da glia diferenciadas a partir de células estaminais de origem humana. No nosso laboratório têm sido desenvolvidos modelos tridimensionais (3D) de células neurais, fazendo uso de tecnologia de biorreactores (Santos *et. al.*, 2007; Serra *et. al.*, 2009). Estes modelos aproximam-se mais das condições *in vivo*, por exemplo em termos de interacção célula-célula e célula-matriz extracelular, relativamente às culturas clássicas em monocamada.

### **Objectivos**

O principal objectivo deste trabalho será avaliar a transdução de neuroesferas diferenciadas e investigar os mecanismos de entrada e transporte viral num contexto celular 3D. Neste projecto, far-se-á uso de um modelo 3D *in vitro* do Sistema Nervoso Central já implementado no laboratório

- células estaminais neurais humanas (hNSCs) (Storch *et. al.* 2001; Wegner *et. al.*, 2008), são cultivadas em agregados (neurosferas) utilizando sistemas de cultura agitados, sendo posteriormente diferenciadas nas 3 linhagens neurais - neurónios, astrócitos e oligodendrócitos.

A eficiência de transdução e o seu impacto na sobrevivência celular e composição das neurosféricas serão avaliados recorrendo a um vector CAV-2 codificando a proteína repórter GFP. O perfil de transdução será ainda caracterizado, em termos de ligação do vírus às células-alvo e tráfego intracelular. Variáveis como a multiplicidade de infecção (MOI, número de vírus por célula no momento da infecção) e tempo de cultura óptimo para a infecção (TOI) serão optimizadas.

**Principais Metodologias:** Cultura de células estaminais neuronais (sistemas de cultura estáticos e agitados), manipulação de vectores adenovirais, microscopia de imunofluorescência, citometria de fluxo, Western Blot e RT-PCR quantitativo.

Bru T, Salinas S, Kremer EJ (2010) An Update on Canine Adenovirus Type 2 and Its Vectors. *Viruses*. 2, 2134-2153.

Santos SS, Leite SB, Sonnewald U, Carrondo MJ and Alves PM (2007). Stirred vessel cultures of rat brain cells aggregates: characterization of major metabolic pathways and cell population dynamics. *J Neurosci Res* 85, 3386-3397.

Serra M, Brito C, Costa E, Sousa MFQ, Alves PM (2009) Integrating human stem cell expansion and neuronal differentiation in bioreactors, *BMC Biotechnology*, 8: 92.

Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvey PM, Kupsch A, Schwarz J (2001). Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol*. 170, 317-25.

Wegner F, Kraft R, Busse K, Härtig W, Schaarschmidt G, Schwarz SC, Schwarz J and Hevers W (2008). Functional and molecular analysis of GABA receptors in human midbrain-derived neural progenitor cells. *J Neurochem*. 107, 1056-69.