

Plano de trabalhos para tese de Mestrado

Tema: Desenvolvimento de modelos *in vitro* de células humanas de cérebro para avaliação de vectores para terapia génica

Orientadores: Doutora Paula Marques Alves, Doutora Catarina Brito

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

Duração da componente experimental: 1 ano

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 e a sua expressão a longo prazo conduz a um eficiente transporte do material genético especificamente para neurónios. O projecto europeu BainCAV, no qual este estágio está integrado, propõe-se a utilizar o potencial de vectores CAV-2 para melhor compreender, e possivelmente tratar, a doença de Parkinson.

A aplicação da terapia génica está 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 provocada 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.

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-astrocítico, 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 vitro*, é limitada. Alternativas possíveis passam pela utilização de neurónios e células da glia diferenciadas a partir de células estaminais de origem humana. Por outro lado, há abordagens inovadoras, como os sistemas de cultura tridimensionais (3D), que se aproximam mais das condições *in vivo*, por exemplo em termos de interacção célula-célula e célula-matrix extracelular, que as culturas clássicas em monocamada.

Objectivos e Metodologias

Neste projecto, o principal objectivo será o desenvolvimento de um sistema celular modelo tridimensional (3D) de cérebro. Serão utilizadas células estaminais neuronais humanas (hNSCs), com capacidade de diferenciarem nas linhagens do sistema nervoso central, incluindo neurónios e células da glia (Storch *et. al.* 2001; Wegner *et. al.*, 2008). Fazendo uso da experiência do nosso grupo em tecnologia de bioreactores, no desenvolvimento de sistemas de cultura tridimensionais (3D) e na cultura de células estaminais (Santos *et. al.*, 2007; Serra *et. al.*, 2007, 2009), as células

serão cultivadas em agregados (neurosferas) em tanques agitados. Serão otimizadas diversas variáveis que poderão afectar a diferenciação e a funcionalidade das células neuronais (formulação do meio de cultura, osmolaridade, pH, O₂, tensão de corte) e avaliadas novas abordagens para cultura 3D, nomeadamente modos de operação de cultura em perfusão. A performance metabólica da cultura será monitorizada pela determinação das taxas de consumo de glucose e glutamina e produção de lactato e amónia, bem como consumo de O₂. A caracterização das neurosferas em termos de composição celular implicará a utilização de metodologias como: microscopia de imunofluorescência, citometria de fluxo, Western Blot e RT-PCR quantitativo.

Numa fase final, o modelo celular 3D será transduzido com vectores CAV-2 codificando a proteína repórter GFP.

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, Leite SB, Brito C, Costa J, Carrondo MJ and Alves PM (2007). Novel culture strategy for human stem cell proliferation and neuronal differentiation. *J Neurosci Res* 85, 3557-3566.

Serra M, Brito C, Leite SB, Gorjup E, von Briesen H, Carrondo MJ and Alves PM (2009). Stirred bioreactors for the expansion of adult pancreatic stem cells. *Ann Anat* 191, 104-115.

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.