

BOLETIM

spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

biotecnologia

Sociedade Portuguesa de Biotecnologia

Série 2 . Número 4 . Novembro de 2013 . Publicação Quadrimestral ISSN 1645-5878



Biotecnologia na Saúde



Dimensões Paralelas

Biorreatores para Cultura Celular da DASGIP®

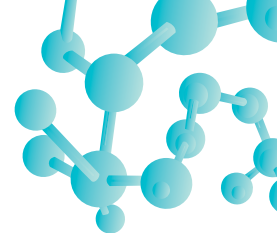
A gama de biorreatores de bancada da DASGIP da Eppendorf é conhecida pelo processo em paralelo, controlo preciso e gestão da informação de forma compensiva.

Desfrute da melhor escalabilidade, dos resultados fiáveis e da rentabilidade dos seus processos.

- > Desenvolvimento mais rápido dos processos com células animais, humanas ou de insetos
- > Volumes de trabalho de 35 mL a 3,8 L
- > Controlo em paralelo de 4, 8 ou mais biorreatores descartáveis ou de vidro, de forma precisa
- > Gestão da informação de forma compensiva e Desenho Experimental

www.eppendorf.pt

DASGIP® é uma marca registada da DASGIP Information and Process Technology GmbH, Juelich, Alemanha. Eppendorf® e o logo da Eppendorf são marcas registadas da Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha. Todos os direitos reservados, incluindo gráficos e imagens. Copyright © 2013 by Eppendorf AG.



A Biotecnologia tem vindo a contribuir decisivamente para o desenvolvimento de vários setores de atividade, sendo a Saúde um dos setores no qual tem tido maior impacto. São várias as aplicações da biotecnologia na saúde, tais como a produção de vacinas e antibióticos, o desenvolvimento de novas drogas, técnicas de diagnóstico molecular, terapias regenerativas e o desenvolvimento da engenharia genética para tratar doenças através de manipulação genética. Exemplos relevantes de investigação na área da Biotecnologia para a Saúde são a terapia celular e medicina regenerativa, terapia génica e as medicinas baseadas em moléculas biológicas como a terapia com anticorpos.

A importância da Biotecnologia na saúde e o elevado número de investigadores que, em Portugal, desenvolvem atividades inovadoras e de elevada qualidade justificam plenamente que, na sequência dos números temáticos anteriores, a SPBT publique um Boletim dedicado à Biotecnologia e ao seu impacto na saúde.

Esperamos que este boletim, para além de evidenciar a divulgação das atividades em Biotecnologia para a Saúde em Portugal, seja mais uma afirmação da excelência da investigação em Biotecnologia em Portugal e contribua para a atração de jovens investigadores para esta área de conhecimento.

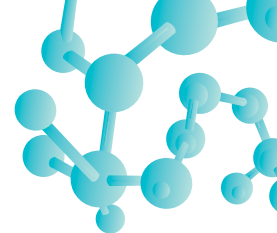
José Teixeira
(Presidente da SPBT)

Contamos com todos para uma
SPBT dinâmica e participativa



Índice

- 1 Editorial**
José A. Teixeira; Presidente da SPBT
- 3 Opinião: novidades e obstáculos no desenvolvimento de um medicamento de terapia avançada em Portugal**
Jorge M. Santos, ECBio
- 5 Células estaminais do sangue do cordão umbilical: um esclarecimento**
Gonçalo J. M. Cabrita, Jorge M. C. M. Pereira, Perpétua M. N. P. Formosinho, Bioteca
- 9 Polímeros e próteses vasculares**
Alexandre F. Leitão e Miguel Gama, U. Minho
- 12 Desenvolvimento de novos biomateriais para aplicação na área da medicina regenerativa**
Ilídio J. Correia, U. Beira Interior
- 14 Abordagens de biologia sintética para o diagnóstico e tratamento do cancro**
Lígia R. Rodrigues, U. Minho
- 17 Sistemas de cultura 3D para diferenciação neural de células estaminais humanas**
Daniel Simão, Catarina Pinto, Margarida Serra, Catarina Brito, Paula M. Alves, IBET/ITQB-UNL
- 21 Terapia génica e desafios no desenvolvimento de vectores virais**
Paulo Fernandes, Rute Castro, Paula M. Alves, Manuel J.T. Carrondo e Ana S. Coroadinha, IBET/ITQB/FCT-UNL
- 24 A importância da purificação de plasmídeos para terapia génica**
Fani Sousa, U. Beira Interior
- 28 Design, construção e produção de minicírculos como vectores de entrega de genes**
Michaela Simcikova, Duarte M. F. Prazeres, Gabriel A. Monteiro, IST-UL
- 31 Bioengenharia de células estaminais pluripotentes humanas para aplicação clínica**
Cláudia Correia, Nuno Espinha, Catarina Brito, Margarida Serra, Paula M. Alves, IBET/ITQB-UNL
- 34 Células estaminais pluripotentes induzidas – elenco promissor para o futuro da medicina**
Ana C. Matias, Ivette Pacheco-Leyva, Gisela Machado-Oliveira, Daniel V. Oliveira e José Bragança, U. Algarve
- 37 No caminho para a aplicação terapêutica das células estaminais, extraídas a partir da matriz do cordão umbilical (UCX®), na regeneração do músculo cardíaco após enfarte do miocárdio**
Jorge M. Santos, Rita N. Bárcia, Mariana Filipe, Mariana Teixeira, Pedro Cruz e Helder Cruz, ECBio
- 41 Estratégias de identificação de novos alvos para combater as infeções por bactérias do complexo *Burkholderia cepacia***
Sílvia A. Sousa, Christian G. Ramos, André M. Grilo, Joana R. Feliciano, Paulo J.P. da Costa, Jorge H. Leitão, IST-UL
- 44 Biotecnologia e inovação terapêutica: bactérias e produtos seus derivados como agentes anticancerígenos**
Nuno Bernardes, Arsénio M. Fialho, IST-UL
- 48 Utilização de *Drosophila* como modelo animal para a identificação de biomarcadores e de compostos com atividade biológica**
Joana O. Branco e Nuno A. Faustino, Gene PreDiT
- 50 O potencial biotecnológico dos bacteriófagos na deteção e controlo de bactérias patogénicas**
Joana Azeredo, U. Minho
- 54 Sistemas preditivos nas neuropatologias com base nas interações proteína:proteína**
Odete A. B. da Cruz e Silva, U. Aveiro



Opinião: novidades e obstáculos no desenvolvimento de um medicamento de terapia avançada em Portugal

Jorge M. Santos

ECBio, Investigação e Desenvolvimento em Biotecnologia S. A.

Rua Henrique Paiva Couceiro, 27, 2700-451 Amadora, Portugal

E-mail: miguel.santos@ecbio.com

A nova geração de Medicamentos para Terapias Avançadas (*Advanced Therapy Medicinal Products* – ATMP) à base de células somáticas (*Somatic Cell Therapy Medicinal Product* – SCTMP) compreende biofármacos consistindo de células vivas e viáveis. As suas potencialidades têm gerado enormes expectativas mas também muitas dúvidas e apreensão, dado possuírem entidade genética. Talvez a abordagem inicial das autoridades regulamentares, e refiro-me à *Food and Drug Administration* e à *European Medicines Agency* (FDA-EMA ATMP Harmonization Cluster, 2008), tentando forçar um enquadramento dos ATMP na regulamentação existente para os fármacos ditos “tradicionais”, derivados da síntese química, não tenha sido a mais indicada. Cedo se percebeu que as questões de segurança (nível de manipulação do tecido de origem e das próprias células durante o processo de fabrico, relacionado com o fenótipo do produto), as noções de farmacocinética, farmacodinâmica, de uso homólogo ou heterólogo, e mesmo a própria definição do produto (como por exemplo identificação da *substância activa* e definição de *potência* para um uso determinado) teriam que ser abordadas numa perspectiva muito diferente da tradicional e caso-a-caso. Esta abordagem está hoje claramente patente no *Draft guideline on the risk-based approach according to Annex I, part IV of Directive 2001/83/EC*, de 19 Janeiro 2012. Aqui, o método de abordagem para a construção dos módulos 2 (Sumários de Abordagem), 3 (Qualidade) e 4 (Relatórios Não-Clínicos) do *Common Technical Document* (CTD), documento base para requerer autorização para introdução no mercado (*Market Authorization* - MA) para um ATMP, propõe-se ser uma análise de mitigação de risco. Neste, o método consiste na identificação prévia dos riscos, e respectivos factores de risco, inerentes ao desenvolvimento e natureza de um determinado produto tendo em atenção acima de tudo a segurança para o paciente. Esta nova abordagem não deverá ser encarada como menos exigente do que a tradicional mas sim, como uma forma de “libertar” os ATMP de estigmas prévios não aplicáveis, aumentando a responsabilidade dos comités para as terapias avançadas da EMA (*Committee for Advanced Therapies* – CAT, EMA). Esta responsabilização não veio, em minha opinião, facilitar a vida aos promotores, como sejam as PME's de base biotecnológica, como a ECBio, pois a percepção de risco dos membros mais conservadores dos CAT pode representar uma barreira difícil de ultrapassar. Fica também por isso, agora claro, que a interacção dos promotores com as autoridades regulamentares deve começar cedo durante o processo de desenvolvimento, sendo muito aconselhável optar pela via da certificação ATMP antes da apresentação do pedido de

MA (*Guideline on the minimum quality data for certification of ATMP*, 15 October 2010 EMA/CAT/486831/2008/corr, 2010).

Até agora na Europa apenas 1 ATMP, num total de 6 pedidos, mereceu a MA (ChondroCelect da TiGenix, 2010) e ainda que existam perto de 50 processos de certificação ATMP bem-sucedidos, nenhum deles teve origem em Portugal. Estes números baixos não são no entanto de estranhar dado o carácter inovador destes produtos, e a “inconstância” recente no ambiente regulamentar, aliados ao facto da maioria destes projectos estar ainda nas mãos de PME's, de recursos geralmente limitados. No entanto, e dado o papel relevante que a indústria biofarmacêutica poderá vir a ter no desenvolvimento das economias, penso ser útil nesta altura identificar alguns obstáculos mais idiossincráticos do nosso país:

1- **Existem ambiguidades e dispersão na demarcação de responsabilidades, pelos organismos que monitorizam as boas práticas, de acordo com as directivas e decretos-lei relacionados.** Nomeadamente, a directiva 2004/23/CE do parlamento Europeu e do Conselho de 31 de Março de 2004, para o estabelecimento de normas de qualidade e segurança no que diz respeito à dádvia, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento e distribuição de tecidos e células de origem humana, transposta para a Lei em vigor, nº12/2009, de 26 de Março e nomeia um organismo já extinto, a Autoridade para os Serviços de Sangue e da Transplantação (ASST), enquanto autoridade competente para garantir práticas essenciais à colheita de material biológico para o desenvolvimento dum SCTMP. Sabemos hoje que a ASST, sob a égide do Departamento da Qualidade na Saúde da Direção-Geral da Saúde (DGS), detém a responsabilidade de aprovar os bancos e centros de recolha de tecidos e células para fins terapêuticos. No entanto, o Instituto Português do Sangue e Transplantação (IPST), um organismo independente da DGS, chama a si a missão de *garantir e regular, a nível nacional, a atividade da medicina transfusional e da transplantação e garantir a dádvia, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento e distribuição de sangue humano, de componentes sanguíneos, de órgãos, tecidos e células de origem humana*. Segundo o que me permiti apurar, a conformidade com da Lei nº12/2009, relativa à colheita em Portugal de órgãos, tecidos e células, de origem humana, para fins de desenvolvimento dum SCTMP, é da DGS, mas passa a ser da responsabilidade do IPST, caso as amostras circulem de/para Portugal para/de outro estado-membro. O IPST chama a si também a responsabilidade da farmacovigilância, tendo que ser reportado a este organismo

qualquer incidência na manipulação e/ou administração de amostras de tecidos ou células que ponham em risco a saúde pública ou a de um paciente específico. Esta dispersão de competências não são salutares para uma eficiente programação das linhas de desenvolvimento.

2- **A orgânica de funcionamento de algumas das nossas instituições não é compatível com o desenvolvimento em tempo útil de SCTMPs por PMEs.** Numa área tão competitiva com esta, em que os promotores de cariz privado têm normalmente que correr contra o tempo, por razões concorrenciais (científicas e outras), e/ou de *timings* impostos por investidores, o ambiente institucional em Portugal está longe de ser o ideal. As comissões de ética dentro dos hospitais reúnem com intervalos de tempo demasiado prolongados. No caso da recolha das amostras, e manutenção da respectiva confidencialidade do dador, outras instituições, como seja a Comissão Nacional de Protecção de Dados Pessoais (CNPDP), pode tardar 1 ano a dar um parecer. Uma vez mais, e ainda a propósito da protecção de dados pessoais, a organização interna das instituições prestadoras de cuidados de saúde, onde são colhidas as amostras biológicas, não está agilizada por forma a aplicar a Lei nº 12/2005, de 26 de Janeiro, relativa ao tratamento da informação genética pessoal e informação de saúde. Segundo a lei, a identidade do dador deve permanecer arquivada, junto com o respectivo consentimento informado, sob o cuidado do clínico responsável pelo estudo na instituição de prestadora de cuidados de saúde. A amostra doada sai da instituição de forma codificada, assegurando assim o anonimato do dador.

3- **O envolvimento das equipas médicas nos estudos em curso revela duas formas distintas de encarar a investigação científica.** A investigação científica em Portugal é feita na maioria por biólogos ou farmacêuticos, ou profissionais vindos de áreas académicas afins, tendo um cariz translacional reduzido. De facto, Portugal nos últimos anos tem vindo a destacar-se pela positiva em diversas áreas científicas, mas todas tendo como base a investigação fundamental. Por outro lado, a investigação realizada por clínicos, padece de resultados aplicáveis, e baseia-se principalmente em ciência descritiva e observacional, fruto da ausência de tempo e meios que têm em Portugal os clínicos de carreira. Para que isto aconteça, terá que ser ainda criada uma carreira de investigação clínica alician-te e apetecível para os praticantes de medicina que são formados numa sociedade onde o seu reconhecimento está ainda muito restringido à sua relação directa com o doente. Centros de Investigação Clínica, como seja, por exemplo, o recentemente criado CIC, associado ao IMM/FMUL, poderão servir de interface entre investigadores e clínicos, criando ao mesmo tempo estruturas dedicadas que facilitem a organização e monitorização dos ensaios clínicos. O ideal no futuro, seria estes centros tornarem-se incubadoras de verdadeiros investigadores clínicos preenchendo a lacuna de MD-PhDs ainda existente no nosso país, acção fundamental para promover em Portugal a translação *bench-to bedside*.

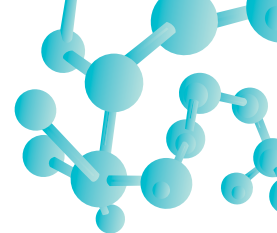
4- **O envolvimento das equipas médicas nos estudos em curso revela alguma falta de cultura de cooperação com PME's nacionais.** A investigação científica em Portugal é realizada, na sua grande maioria, em ambiente académico. As empresas privadas não são ainda vistas como detentoras de condições e cultura científicas. A cultura eco-

nómica está demasiadamente virada para os serviços, e a inovação na área da biofarmacêutica é ainda vista como algo que se faz "lá fora". A cooperação com o sector privado fora da *Big Pharma* sofre muitas vezes de descriminação negativa, gerando em muitos meios, incluindo o das comunidades médicas, um sentimento de desconfiança.

5- **O desenvolvimento de terapias celulares não é ainda, genericamente visto pelos clínicos, como uma verdadeira alternativa.** As especificidades da indústria biofarmacêutica, sem tradição em Portugal, não são ainda reconhecidas pela generalidade da comunidade médica, e mesmo os hospitais universitários em Portugal não estão logisticamente preparados para produzir um produto celular para administração clínica, que exija manipulação em salas limpas devidamente certificadas para boas práticas de fabrico (GMP para terapias celulares).

6- **Estaremos preparados para avançar com a obtenção de provas de conceito ao abrigo da isenção hospitalar?** Dado o processo sinuoso, prolongado, e carenciado de elevado investimento financeiro, que envolve a promoção dum ensaio clínico, o desenvolvimento e credibilização dos SCTMPs passará certamente pela sua aplicação inicial ao abrigo da *isenção hospitalar*. A isenção hospitalar, na área biofarmacêutica, trata-se da aplicação clínica dum ATMP, tal como definido na Regulamentação Europeia (EC) NO 1394/2007. Este foi criado numa base de não-rotina (a definição das fronteiras da rotina têm gerado ampla discussão) e de acordo com critérios de qualidade, específicos para um determinado estado-membro da UE, administrado dentro desse mesmo estado-membro, em ambiente hospitalar, e sob a égide e responsabilidade exclusiva dum clínico, que prescreve o ATMP concebido à medida para um determinado paciente. Os requisitos de rastreabilidade e farmacovigilância neste processo, assim como os critérios da qualidade, são equivalentes aos definidos pela CE no que respeita aos ATMPs. Abre-se assim a porta para que, no âmbito duma colaboração entre uma equipa clínica e um promotor de desenvolvimento dum SCTMP, após aprovação pelo INFARMED e Comissão de Ética e Conselho de Administração do hospital, se efectuem as provas-de-conceito necessárias para ultrapassar as muitas barreiras que ainda enfrentam estas novas terapias. Em Portugal, se ultrapassarmos alguns dos pontos anteriormente listados, seguramente seremos tão bons como os restantes promotores de novas terapias de nível internacional.

Nota: o texto acima é da exclusiva responsabilidade do autor, não refletindo por isso, a posição de qualquer uma das instituições mencionadas.



Células estaminais do sangue do cordão umbilical: um esclarecimento

Gonçalo J. M. Cabrita, Jorge M. C. M. Pereira, Perpétua M. N. P. Formosinho

Bioteca - Preservação de Células Estaminais, S.A.

Pólo Tecnológico de Lisboa, Estrada do Paço do Lumiar, Lote 1, 1600-546 Lisboa

E-mail: pformosinho@bioteca.pt

Resumo

A criopreservação do sangue do cordão umbilical (SCU) é ainda um tema envolvido em discursos polémicos, contraditórios e na maior parte das vezes pouco claros e esclarecedores, quer para a comunidade dos profissionais de saúde, quer para a sociedade em geral. Neste artigo propomos um esclarecimento acerca de algumas ideias pré-concebidas sobre este tema.

O conceito que o SCU actualmente ainda não é, ou é pouco utilizado no tratamento de doenças, é errado. Isto mostra desconhecimento dos dados disponíveis que revelam há mais de 25 anos o uso do SCU na área dos transplantes como fonte de células estaminais (CE) hematopoiéticas para a terapia de doenças tratáveis com transplante de medula óssea, tais como leucemia e outros cancros, outras doenças do foro sanguíneo, doenças metabólicas e doenças do sistema imunitário, tendo já sido efectuados mais de 25.000 transplantes [1, 2]. Os dados relativos aos transplantes hematopoiéticos realizados apenas na Europa no ano 2011, publicados pelo *European Group for Bone Marrow Transplantation* (EBMT), listam 833 transplantes com SCU [3]. A importância e interesse médico nesta área são corroborados pelos mais de 20000 artigos científicos publicados nesta área [4].

O conceito que o SCU não possui um número de células suficiente para o tratamento ser eficaz, nomeadamente em adultos, é errado. Tendo em conta, por um lado, 6.276 transplantes de SCU efectuados em adultos e 4.812 efectuados em crianças, citados pela Fundação NetCord [5], e por outro lado, as várias estratégias que têm vindo a ser desenvolvidas, como o uso de duas unidades de SCU, a expansão celular, e mais recentemente a co-infusão de outros tipos de CE, como por exemplo as células mesenquimais [6-9], o uso de SCU em adultos é cada vez mais uma realidade.

O conceito que as células do SCU nunca poderão ser utilizadas para o tratamento do próprio dador, uma vez que já contém a doença, é errado. São realizados todos os anos milhares de transplantes autólogos usando CE provenientes de sangue periférico, medula óssea ou mesmo de SCU [10]. São exemplo das doenças descritas: linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, anemia severa aplásica, mieloma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, tumores cerebrais e outros tumores sólidos [11-13]. Apesar de existirem dados publicados [14] que descrevem o tratamento com CE para leucemias desenvolvidas no primeiro ano de vida do bebé com resultados semelhantes quer para tratamento autólogo quer para alogénico, mantém-se não indicada à partida a utilização autóloga, assumindo-se os mesmos critérios aplicáveis às doenças ge-

néticas [15-17]. Contudo, quando este tipo de doença ocorre numa fase mais tardia, as CE do SCU do dador podem ser uma alternativa preferível às suas células adultas, dado que nestas últimas existe o risco da existência de células tumorais residuais que podem levar à recidiva da doença. Além disso, nos casos em que as CE não podem ser utilizadas em contexto autólogo, a utilização em contexto familiar (células de um irmão) aparece como a seguinte melhor opção, justificando-se a criopreservação aquando do nascimento de cada filho. Mesmo quando poderão existir já células pré-leucémicas no recém-nascido, devem efectuar-se testes para detecção destas células no SCU e não pressupor a sua presença, descartando a utilização da unidade de SCU [18]. De acordo com o EBMT, do total dos transplantes realizados em 2011 (medula óssea, sangue periférico, SCU) nas 651 unidades de aplicação europeias, 58% foram transplantes autólogos e 42% transplantes alogénicos não relacionados [3], tendo sido registados 52 transplantes familiares com SCU. Além disso, também estão descritos casos de utilização autóloga de SCU provenientes de bancos familiares, em tratamentos de neuroblastoma [12], anemia aplásica [11, 13, 19], leucemia linfoblástica aguda [18] e mais recentemente paralisia cerebral [19].

O conceito que a probabilidade de utilização do SCU para uso autólogo é ínfima, é errado. Muitos dos valores normalmente citados para esta probabilidade não apresentam qualquer estudo fundamentado, tratando-se de meras opiniões. As estimativas devem ter em conta factores tais como, a incidência da doença, a taxa de necessidade de transplante e a probabilidade de encontrar um dador compatível. O estudo mais recente, baseado no número e frequência dos transplantes, na taxa de ocorrência das doenças e em dados demográficos, confirma que a probabilidade é baixa, estimando que ao longo da vida a probabilidade de um indivíduo precisar de um tratamento com CE é de cerca de 1:200 e para um transplante autólogo cerca de 1:400. Nos primeiros 20 anos de vida, as hipóteses de uma pessoa vir a necessitar de um transplante autólogo são cerca de 1:5000 [20]. Estas estimativas contabilizam apenas as doenças para as quais o SCU já é utilizado em contexto hematopoiético, não in-

cluindo os resultados obtidos em estudos experimentais de utilização do SCU em contexto autólogo no tratamento de doenças como a diabetes de tipo 1 ou lesões cerebrais. É de relembrar que a existência dos bancos familiares é relativamente recente, sendo que a maioria dos indivíduos não tem o seu SCU armazenado, pelo que as estimativas disponíveis estão condicionadas a este facto. Por outro lado, convém recordar que, tal como já mencionado acima, cerca de 58% dos transplantes hematopoiéticos efectuados na Europa em 2011 foram autólogos, o que indicia uma clara aplicabilidade deste tipo de transplantes. O facto da indicação mais frequente deste tipo de tratamento ser para mieloma múltiplo e linfoma não-Hodgkin [10] indicia que os doentes serão tipicamente adultos, o que implica que o SCU ainda não teve tempo para poder demonstrar a sua aplicabilidade, embora este quadro possa vir a alterar-se no futuro.

O conceito que nunca são utilizadas unidades provenientes de bancos familiares, é errado. O sucesso dos primeiros transplantes com SCU levou à criação de bancos para processamento e armazenamento das unidades de SCU, podendo os mesmos serem públicos (as unidades são doadas para uso em doentes não relacionados) ou familiares (as unidades são armazenadas para uso familiar). Os bancos públicos, para os quais o dador não efectua qualquer tipo de pagamento, armazenam unidades tendo em conta determinadas características, tais como área geográfica ou perfis de histocompatibilidade menos frequentes, sendo suportados por fundos estatais e pelo pagamento da distribuição das suas unidades para transplante. Nos bancos familiares, os pais são proprietários das unidades armazenadas, efectuando o pagamento do serviço correspondendo a um montante pago no início do mesmo. Será sempre a equipa médica que acompanha a família a avaliar e determinar, em caso de doença, se o uso das CE do SCU será o tratamento mais adequado, uma vez que têm de ser pesados vários factores que influenciam a decisão de efectuar o transplante. Deve ser realçado que nos bancos familiares, tal como o nome indica, não se armazena exclusivamente com indicação de utilização no próprio mas sim e até com maior probabilidade para utilização entre membros da família, especialmente irmãos. Diferentes estudos salientam que o transplante relacionado, associado ao baixo risco de incidência da doença do enxerto contra o hospedeiro, oferece uma boa probabilidade de sucesso, pela redução quer de complicações relacionadas com o transplante, quer da taxa de mortalidade [21]. Os dados de 2008 do maior banco familiar dos EUA revelam a disponibilização de 61 unidades de SCU [22]. Thornley *et al.*, apresentam em 2009 a utilização de unidades provenientes de bancos familiares, tendo sido usadas 9 em transplantes autólogos e 41 em transplantes alogénicos [23]. Dados mais actuais dos 2 maiores bancos familiares nos EUA, revelam a disponibilização de 201 unidades de SCU entre 1993 e 2012 (134 para uso autólogo, 67 para uso relacionado – 66 em irmãos e 1 na mãe) [24] e 250 unidades de SCU entre 1996 e 2012 (99 para uso autólogo, 151 em irmãos) [25].

O conceito que os bancos familiares funcionam à margem da legislação aplicável para esta actividade, é errado. Em Portugal a Lei 12/2009 de 26 de Março regulamenta a activi-

dade dos bancos de SCU, existindo uma autoridade competente que fiscaliza e controla a qualidade de todo o processo, quer nas entidades públicas, quer nas privadas, repartida entre o Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST) e a Direcção Geral da Saúde (DGS). A Bioteca está autorizada pelo Ministério da Saúde (DGS).

O conceito que os parâmetros de qualidade nos bancos familiares são inferiores aos dos bancos públicos, é errado.

Na Bioteca, são definidos critérios de aceitação/rejeição das unidades de SCU, tais como volume de sangue, condições de transporte desde as unidades de colheita até ao banco, integridade dos contentores de transporte, identificação, etapas de processamento, contaminação microbiológica e contagem de células. Também é efectuado o processo de selecção e acompanhamento de dador baseado na avaliação de antecedentes familiares para minimizar o risco de transmissão de doenças infecciosas. Toda esta informação está disponível no processo de criopreservação (incluindo doenças hereditárias), aquando da disponibilização da unidade à Unidade de Transplante. Além disso, também é assegurado o consentimento informado por parte da mãe relativo ao processo. É da responsabilidade dos profissionais de saúde e dos bancos de SCU prestar uma informação clara, fidedigna e inequívoca aos Pais acerca das vantagens e desvantagens associadas a cada tipo de serviço, incluindo as questões do foro científico, legal e ético e as aplicações terapêuticas actuais e futuras, como estipulado legalmente.

O conceito que não é viável a coexistência de bancos públicos e bancos familiares, é errado.

A maioria das posições contra os bancos familiares resulta de dados infundados, desactualizados, equívocos e desconhecimento da literatura. Os bancos familiares e públicos podem coexistir, cada um com a sua função, pois existem unidades de SCU que podem ser utilizadas em cada contexto, incluindo para investigação. Para todos os doentes sem um dador compatível na família tem de existir uma alternativa, podendo decidir-se qual a melhor escolha no momento em que existir essa necessidade: dadores não relacionados, com uma probabilidade <0,01% de se encontrar um dador compatível ou o SCU armazenado com 100% de auto compatibilidade. Os dados disponíveis relativos aos registos de dadores a nível internacional indicam a necessidade contínua de alternativas a dadores quando não são encontrados compatíveis (aproximadamente 1/3 dos doentes) [1]. Assim, o SCU surge como uma alternativa na área dos transplantes. A limitação do armazenamento em contexto familiar apenas a casos em que é conhecida uma situação clínica na família (por exemplo cancro ou doença genética) onde é indicado o transplante não dá resposta a todos os casos sem dador compatível disponível. Por outro lado, os bancos públicos apenas pretendem armazenar menos de 1% do SCU de um dado país [26], pelo que os restantes 99% serão descartados se não forem armazenados num banco familiar. O conceito de que os bancos familiares geram acesso desigual da população ao serviço, tendo em conta as suas condições económicas e sociais, levanta a questão se existe lugar para a medicina privada. No entanto, na área da saúde existem muitos serviços privados aos quais só tem acesso uma faixa específica da sociedade.



iBET Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica

Biopharmaceuticals and Novel Therapies

Mobilize the purpose-driven expertise of iBET to gain insightful, thorough development of your biotechnology products. With 25 years experience, we offer a most comprehensive package of services in the area of Biopharmaceuticals and Novel Therapies. Our range of services includes:

Animal Cell Technology

- Cell Line Development
- Bioprocess Development for Recombinant Proteins, mAbs, Vaccines and Viral Vectors for Gene Therapy
- Upstream and Downstream Design & Development
- In vitro 3D Models for Pre-Clinical Research
- Stem Cells for Cell Therapy & Drug Discovery

Biopharmaceuticals: Discovery, Production and Characterization

- Pilot Plant Unit (Bioprocess Development and Production up to gram quantities) - Access to GMP production
- cGMP Analytical Services: Cell Based Assays, Mass Spectrometry; Glycosylation and Characterization
- 3D protein structure determination by X-ray crystallography and/or NMR
- Molecular modeling applied to protein structure and enzyme kinetics
- NMR spectroscopy for drug screening and hit optimization
- New targets and more efficient combinatorial therapies

Drug Delivery

- Nano/Micro Encapsulation & Impregnation
- Release kinetics
- Formulation

Biochemical Engineering Tools

- Novel Tools for Extraction and Process Monitoring
- Modeling of Downstream Processing: in Particular Porous Systems
- Systems Biology for Cell Culture and Process Development
- Synthetic Biology Applied to Bioseparation Processes

Contacts:

iBET, Apartado 12
2781-901 Oeiras Portugal
Tel: +351 21 442 11 73
FAX: +351 21 442 11 61
www.ibet.pt

Gonçalo Real, real@ibet.pt

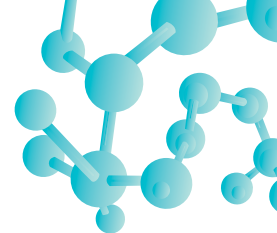
O conceito que não existem estudos que indiquem que é seguro armazenar o SCU por um longo período de tempo, é errado. Além dos estudos da criobiologia celular em geral, a viabilidade do armazenamento é apoiada em estudos com unidades de SCU descongeladas com 10 anos de criopreservação [22], 15 anos [27, 28] e 23 anos [29].

Conclusão

Podemos afirmar que o SCU disponível na placenta após o nascimento de um recém-nascido (normalmente descartado como resíduo biológico) tem um valor terapêutico inquestionável, sendo uma das fontes de CE (progenitores hematopoiéticos) útil no tratamento de várias doenças. De acordo com a evolução nesta área e tendo em conta os casos de sucesso de utilização de SCU em transplantes com unidades armazenadas em bancos familiares, quer em contexto autólogo, quer em contexto familiar e a possibilidade de aplicações futuras em novas áreas terapêuticas com estudos promissores para aplicação autóloga, nomeadamente na medicina regenerativa, Diabetes tipo I, Paralisia cerebral [30], consideramos existirem razões suficientes para a existência e continuidade de bancos de SCU de contexto familiar, tal como a Bioteca.

Referências

- Butler, M.G., Menitove, J.E. (2011) Umbilical cord blood banking: an update. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28, 669-76.
- Gluckman, E., Broxmeyer, H.A., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P. (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.* 321, 1174-8.
- Passweg, J.R., Baldomero, H., Bregni, M., Cesaro, S., Dreger, P., Duarte, R.F., Falkenburg, J.H., Kröger, N., Farge-Bancel, D., Bobby Gaspar, H., Marsh, J., Mohty, M., Peters, C., Sureda, A., Velardi, A., Ruiz de Elvira, C., Madrigal, A. (2013) Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011. *Bone Marrow Transplant.* 48, 1161-7.
- NCBI. (Pesquisa em Out 2013, termo "Umbilical cord blood therapy"). Página: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
- Netcord. (Set 2012). *Inventory*. Página: www.netcord.eu/inventory.html
- Delaney, C., Heimfeld, S., Brashem-Stein, C., Voorhies, H., Manger, R.L., Bernstein, I.D. (2010) Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat. Med.* 16, 232-6.
- Petropoulou, A.D., Rocha, V. (2011) Risk factors and options to improve engraftment in unrelated cord blood transplantation. *Stem Cells Int.* 2011, 610514.
- Ramirez, P., Wagner, J.E., DeFor, T.E., Blazar, B.R., Verneris, M.R., Miller, J.S., McKenna, D.H., Weisdorf, D.J., McGlave, P.B., Brunstein, C.G. (2012) Factors predicting single-unit predominance after double umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 47, 799-803.
- Rocha, V., Broxmeyer, H.E. (2010) New approaches for improving engraftment after cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 16 (1 Suppl), S126-32.
- Baldomero, H., Gratwohl, M., Gratwohl, A., Tichelli, A., Niederwieser, D., Madrigal, A., Frauendorfer, K. (2011) The EBMT activity survey 2009: trends over the past 5 years. *Bone Marrow Transplant.* 46, 485-501.
- Fruchtman, S.M., Hurler, A., Dracker, R., Isola, L., Goldman, B., Schneider, B.L., Emre, S. (2004) The successful treatment of severe aplastic anemia with autologous cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 10, 741-2.
- Ferreira, E., Pasternak, J., Bacal, N., de Campos Guerra, J.C., Mitie Watanabe, F. (1999) Autologous cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 24, 1041.
- Rosenthal, J., Woolfrey, A.E., Pawlowska, A., Thomas, S.H., Appelbaum, F., Forman, S. (2011) Hematopoietic cell transplantation with autologous cord blood in patients with severe aplastic anemia: an opportunity to revisit the controversy regarding cord blood banking for private use. *Pediatr. Blood Cancer.* 56, 1009-12.
- Marco, F., Bureo, E., Ortega, J.J., Badell, I., Verdager, A., Martínez, A., Muñoz, A., Madero, L., Olivé, T., Cubells, J., Castel, V., Sastre, A., Maldonado, M.S., Díaz, M.A. (2000) High survival rate in infant acute leukemia treated with early high-dose chemotherapy and stem-cell support. *J. Clin. Oncol.* 18, 3256-61.
- Hjalgrim, L.L., Madsen, H.O., Melbye, M., Jørgensen, P., Christiansen, M., Andersen, M.T., Pallisgaard, N., Hokland, P., Clausen, N., Ryder, L.P., Schmiegelow, K., Hjalgrim, H. (2002) Presence of clone-specific markers at birth in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Cancer.* 87, 994-9.
- Taub, J.W., Konrad, M.A., Ge, Y., Naber, J.M., Scott, J.S., Matherly, L.H., Ravindranath, Y. (2002) High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 99, 2992-6.
- Fasching, K., Panzer, S., Haas, O.A., Marschalek, R., Gadner, H., Panzer-Grümayer, E.R. (2000) Presence of clone-specific antigen receptor gene rearrangements at birth indicates an in utero origin of diverse types of early childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 95, 2722-4.
- Hayani, A., Lampeter, E., Viswanatha, D., Morgan, D., Salvi, S.N. (2007) First report of autologous cord blood transplantation in the treatment of a child with leukemia. *Pediatrics.* 119, e296-300.
- Jensen, A., Hamelmann, E. (2013) First autologous cell therapy of cerebral palsy caused by hypoxic-ischemic brain damage in a child after cardiac arrest-individual treatment with cord blood. *Case Rep. Transplant.* 2013, 951827.
- Nietfeld, J.J., Pasquini, M.C., Logan, B.R., Verter, F., Horowitz, M.M. (2008) Lifetime probabilities of hematopoietic stem cell transplantation in the U.S. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14, 316-22.
- Shahrokhi, S., Menaa, F., Alimoghaddam, K., McGuckin, C., Ebtekar, M. (2012) Insights and hopes in umbilical cord blood stem cell transplantations. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 572821.
- Harris, D.T. (2008) Collection, Processing, and Banking of Umbilical Cord Blood Stem Cells for Clinical Use in Transplantation and Regenerative Medicine. *LabMedicine.* 39, 173-8.
- Thornley, I., Eapen, M., Sung, L., Lee, S.J., Davies, S.M., Joffe, S. (2009) Private cord blood banking: experiences and views of pediatric hematopoietic cell transplantation physicians. *Pediatrics.* 123, 1011-7.
- Cord Blood Registry. (2013). *Transplant summary*. Página: www.cordblood.com/en/best-cord-blood-bank/~media/Files/FAQs/transplant_summary.pdf.
- Viacord. (2013). *Transplant summary*. Página: www.viacord.com/Images/250TransplantSummary_tcm117-150005.pdf.
- Querol, S., Rubinstein, P., Marsh, S.G., Goldman, J., Madrigal, J.A. (2009) Cord blood banking: 'providing cord blood banking for a nation'. *Br. J. Haematol.* 147, 227-35.
- Broxmeyer, H.E., Srouf, E.F., Hangoc, G., Cooper, S., Anderson, S.A., Boline, D.M. (2003) High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 645-50.
- Kobylka, P., Ivanyi, P., Breur-Vriesendorp, B.S. (1998) Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells. *Transplantation.* 65, 1275-8.
- Broxmeyer, H.E., Lee, M.R., Hangoc, G., Cooper, S., Prasain, N., Kim, J., Mallett, C., Ye, Z., Witting, S., Cornetta, K., Cheng, L., Yoder, M.C. (2011) Hematopoietic stem/progenitor cells, generation of induced pluripotent stem cells, and isolation of endothelial progenitors from 21- to 23.5-year cryopreserved cord blood. *Blood.* 117, 4773-7.
- Forraz, N., McGuckin, C.P. (2011) The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif.* 44 Suppl 1, 60-9.



Polímeros e próteses vasculares

Alexandre F. Leitão e Miguel Gama

Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga

E-mail: fmgama@deb.uminho.pt

Introdução

As doenças cardiovasculares continuam a ser a principal causa de morte em Portugal. Entre estas patologias, a mais comum é a aterosclerose, um espessamento da parede arterial devido à formação de placa. As complicações causadas por esta doença, devidas à oclusão parcial ou total do vaso afectado, bem como lesões no lúmen que poderão originar um trombo, obrigam ao recurso a meios cirúrgicos para restabelecer o fluxo sanguíneo através de uma cirurgia de *bypass*, preferencialmente usando um vaso autólogo. Quando estes vasos não estão disponíveis, devido à progressão natural da doença ou cirurgias de colheita anteriores, a alternativa passa, geralmente, pelo uso de próteses vasculares heterólogas ou sintéticas.

As próteses heterólogas, de origem humana ou animal, oferecem, teoricamente, todas as condições para constituírem uma alternativa viável às próteses autólogas. Estão prontamente disponíveis, com dimensões e características mecânicas e de manuseio apropriadas, bem como patência, em tudo semelhante às próteses autólogas. Contudo, os ensaios clínicos não têm correspondido às expectativas. A principal razão para esta falta de sucesso prende-se com perda de viabilidade associada à degeneração do tecido.

A alternativa actual às próteses de origem biológica são as sintéticas não degradáveis. Estas próteses vasculares permitem salvar milhares de vidas e evitam a amputação de membros, quando a colheita de vasos autólogos não é possível. Contudo, na sua forma actual, estas próteses têm algumas limitações. Em particular, a utilização de próteses com diâmetro interno inferior a 6 mm resulta em oclusão, devido ao carácter trombogénico e deficiente complacência dos materiais, que por sua vez provoca hiperplasia. Nesse sentido, muito trabalho de investigação tem vindo a ser realizado no sentido de melhorar as próteses actualmente disponíveis bem como no desenvolvimento de novos materiais e soluções. Uma prótese vascular deverá necessariamente reunir um conjunto de características inerentes às próteses autólogas: biocompatibilidade, nomeadamente hemocompatibilidade, e propriedades mecânicas adequadas e semelhantes às dos vasos nativos. A hemocompatibilidade está relacionada com a interacção material/sangue e o despoletar da coagulação, trombose ou lise das células sanguíneas, bem como baixo risco de infecção ou indução de uma resposta imune.

Próteses Não Degradáveis

Actualmente, as próteses vasculares sintéticas são feitas a partir de polietileno de tereftalato (PET) e de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE). Para além destes, outros materiais têm vindo a ser estudados com o propósito de desenvolver uma prótese não-degradável de baixo calibre.

O PET - conhecido pelo nome comercial Dacron® - e o ePTFE são inertes e bio-estáveis; contudo, quando em contacto com o sangue activam a via intrínseca de coagulação originando a formação de um coágulo. Este efeito, mais significativo em vasos de baixo calibre e fluxo (<6mm), deve-se à adsorção de proteínas à superfície do material [1, 2]. Várias abordagens, entre as quais impregnação com moléculas bioactivas [3, 4] bem como modificações de superfície [5, 6], foram testadas para melhorar a hemocompatibilidade, promovendo a adesão de células endoteliais.

O poliuretano (PU), o álcool de polivinilo (PVA) e a celulose bacteriana (CB) são outros polímeros que têm vindo a ser estudados no sentido de criar próteses vasculares. Estes três materiais apresentam boa biocompatibilidade, e em particular hemocompatibilidade, bem como propriedades mecânicas e hidrofiliidade adequadas, em particular no caso do PVA e CB, que formam hidrogéis.

As próteses de PU demonstraram já bom desempenho in vivo, com uma rápida endotelização da face luminal, importante para assegurar patência a longo prazo [7]. Foram também estudadas combinações de PU com outros polímeros de forma a melhorar a adesão e proliferação celular no interior do material. De forma semelhante, o PVA tem sido estudado principalmente em compósitos com polímeros naturais e sintéticos, de forma a melhorar as suas propriedades mecânicas bem como promover a adesão e proliferação de células endoteliais [8]. No entanto, poucos estudos demonstram a viabilidade de uma prótese de PVA sem adição de outro componente.

De particular interesse no desenvolvimento de próteses não-degradáveis é a CB (Fig. 1), por ser um polímero natural que, como referido acima, tem propriedades de bio- e hemocompatibilidade bem como mecânicas e morfológicas muito interessantes. Estas propriedades têm sido bem demonstradas por vários grupos, entre os quais o FUNCARB - grupo de investigação em nanobiotecnologia da Universidade do Minho - tem realizado o estudo mais exaustivo nesta área [9-12]. A CB tem sido objecto de estudo há muitos anos na área biomédica, principalmente como cobertura para fe-

ridas e no tratamento de queimaduras [13]. Como prótese vascular a CB mostra algum potencial, havendo estudos que demonstram patência até 3 meses, em ratos, com formação de neo-intima [14]. No entanto, a informação acerca de ensaios *in vivo* é limitada e mais estudos serão necessários para demonstrar o potencial do material. De forma a melhorar a adesão celular, melhorando a patência a longo prazo, já foram realizadas modificações e funcionalização da superfície da CB mostrando resultados promissores.

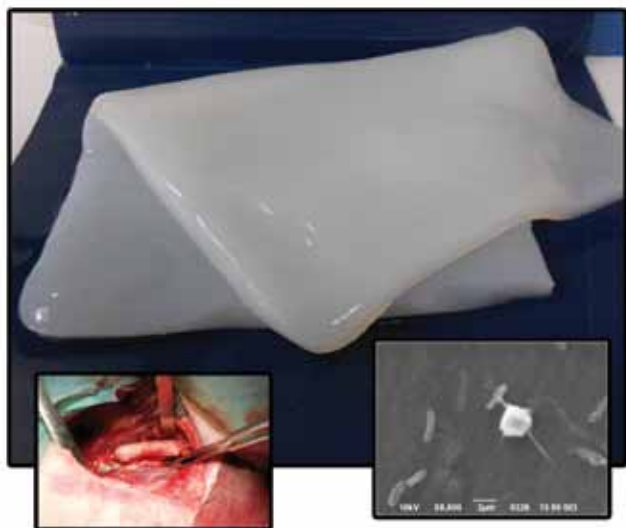


Figura 1 – Membrana de celulose bacteriana (topo) produzida em cultura estática e prótese do mesmo material implantada na artéria femoral (baixo esquerda) do porco; detalhe em MEV da superfície de celulose com células de *G. xylinus* na superfície.

Independentemente do polímero utilizado, é consensual a necessidade de melhorar a adesão de células endoteliais à superfície luminal. A modificação da superfície ou impregnação parece ser o caminho mais seguro para assegurar uma endotelização rápida e confluenta, o que irá afectar positivamente a hemocompatibilidade e patência a longo prazo das próteses.

Próteses Degradáveis

Uma grande parte do esforço de investigação actual dirige-se no sentido do desenvolver próteses por técnicas de engenharia de tecidos. Os polímeros funcionam como uma estrutura de suporte (*scaffold*) que permite a adesão e proliferação celular. O desenvolvimento celular acabará por degradar o *scaffold* e originar um vaso estruturalmente idêntico ao vaso nativo. Vários têm sido os polímeros estudados neste sentido entre os quais constituintes da matriz extracelular nativa (colagénio e elastina), polímeros biológicos (seda) e sintéticos (policaprolactona).

Colagénio e elastina, como foi referido, são constituintes da matriz extracelular nativa, o primeiro conferindo estrutura e rigidez e o segundo elasticidade e flexibilidade. Através da combinação dos dois materiais procura-se evitar a actividade trombogénica do colagénio e assegurar a actividade regulatória da elastina sobre as células de músculo liso e ao mesmo tempo conferindo elasticidade aos *scaffolds* [15, 16].

No entanto, o custo associado ao isolamento de elastina e os métodos de reticulação do colagénio, que envolvem o uso de agentes químicos nocivos, são obstáculos ainda não ultrapassados. Para além disto, a grande maioria das abordagens em estudo envolvem a colonização celular dos *scaffolds* antes da implantação *in vivo* o que implica custos elevados e um processo longo e complexo.

A seda é um promissor polímero natural, biodegradável, biocompatível, possui boas propriedades mecânicas e muito baixa imunogenicidade. Demonstra uma muito boa adesão e proliferação celular que, inclusive, já foi melhorada usando técnicas de biotecnologia, através de modificação da sequência de aminoácidos [16]. As técnicas de produção dos *scaffolds* de seda obrigam a que se proceda a uma impermeabilização como forma de controlar as propriedades mecânicas e porosidade [17]. Os estudos realizados até o momento têm demonstrado boa patência a longo prazo em vasos de pequeno diâmetro, em grande parte devido à rápida endotelização luminal.

A policaprolactona (PCL) é um polímero sintético, biocompatível e biodegradável. Próteses vasculares de PCL podem ser produzidas por electrospinning com porosidades e espessuras variáveis, tendo já sido demonstrada a sua boa endotelização (Fig 2). Alguns estudos têm, no entanto, mostrado que as propriedades mecânicas não são as mais adequadas sendo causa de hiperplasia intimal e calcificação das próteses a longo prazo [18]. As combinações de PCL e outros polímeros (como colagénio e elastina) bem como funcionalização da superfície têm melhorado o desempenho *in vivo* das próteses e continuados estudos poderão fazer o PCL uma alternativa viável [18].

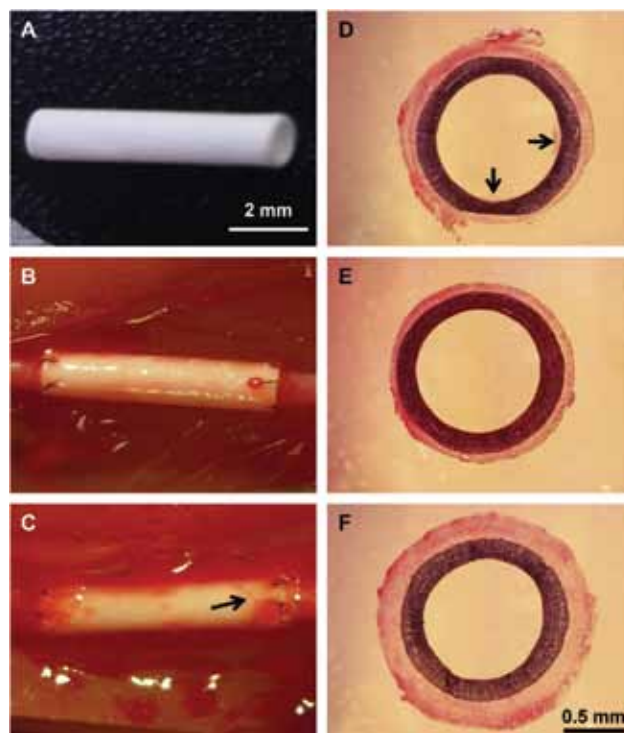
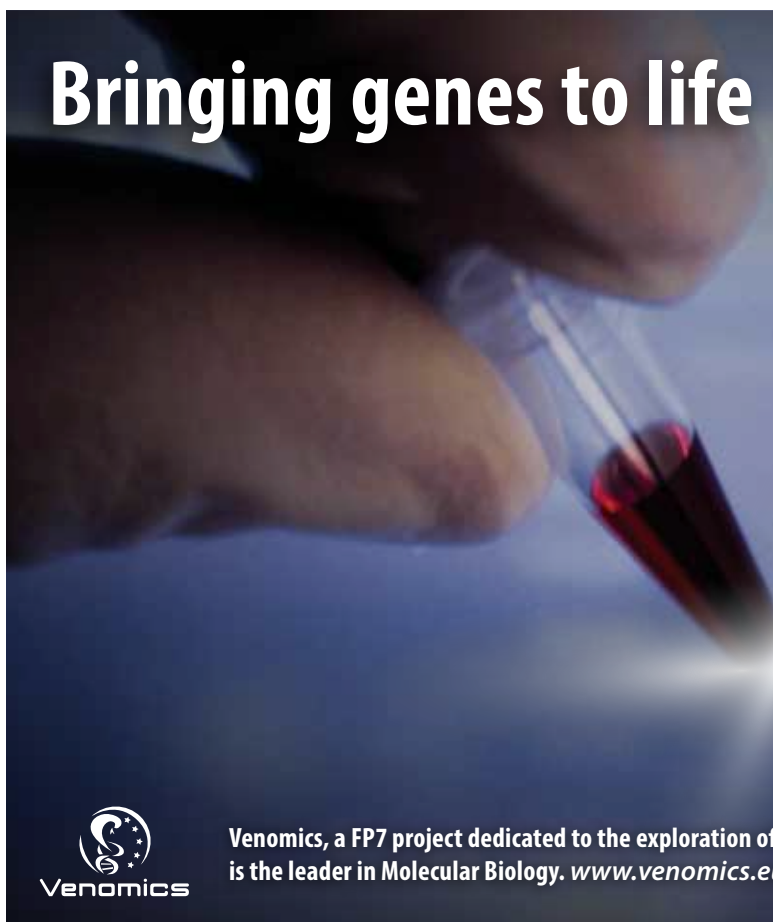



Figura 2 – Caracterização de um *scaffold* de policaprolactona (A) próteses antes de ser implantada, (B) prótese imediatamente após implantação e (C) Prótese tratada com heparina 4 semanas após implantação. Seta sinaliza microvasos na parede da prótese. (D-F) Cortes longitudinais da prótese marcadas com eosina e hematoxilina até 4 semanas de implantação (F). Setas em D indicam a formação de trombo. (Adaptado de Biomaterials, 33(32), Yu *et al*, The effect of stromal cell-derived factor-1alpha/heparin coating of biodegradable vascular grafts on the recruitment of both endothelial and smooth muscle progenitor cells for accelerated regeneration, 8062-74, Copyright 2012, with permission from Elsevier)

Referências

- [1] Holmberg, M.; Hou, X. *Competitive protein adsorption of albumin and immunoglobulin G from human serum onto polymer surfaces*. *Langmuir* 2010, 26(2): 938-42.
- [2] Chlupac, J.; Filova, E.; Bacakova, L. *Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery*. *Physiol Res* 2009, 58 Suppl 2(S119-39).
- [3] Vogt, P.R.; Brunner-LaRocca, H.P.; Lachat, M.; Ruef, C.; Turina, M.I. *Technical details with the use of cryopreserved arterial allografts for aortic infection: influence on early and midterm mortality*. *J Vasc Surg* 2002, 35(1): 80-6.
- [4] Venkatraman, S.; Boey, F.; Lao, L.L. *Implanted cardiovascular polymers: Natural, synthetic and bio-inspired*. *Progress in Polymer Science* 2008, 33(9): 853-874.
- [5] Koromila, G.; Michanetzis, G.P.; Missirlis, Y.F.; Antimisiaris, S.G. *Heparin incorporating liposomes as a delivery system of heparin from PET-covered metallic stents: effect on haemocompatibility*. *Biomaterials* 2006, 27(12): 2525-33.
- [6] Hoshi, R.A.; Van Lith, R.; Jen, M.C.; Allen, J.B.; Lapidus, K.A.; Ameer, G. *The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts*. *Biomaterials* 2013, 34(1): 30-41.
- [7] Hu, Z.-j.; Li, Z.-l.; Hu, L.-y.; He, W.; Liu, R.-m.; Qin, Y.-s.; Wang, S.-m. *The in vivo performance of small-caliber nanofibrous polyurethane vascular grafts*. *BMC Cardiovascular Disorders* 2012, 12(1): 1-11.
- [8] Mathews, D.T.; Birney, Y.A.; Cahill, P.A.; McGuinness, G.B. *Vascular cell viability on polyvinyl alcohol hydrogels modified with water-soluble and -insoluble chitosan*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2008, 84B(2): 531-540.
- [9] Andrade, F.; Pertile, R.; Dourado, F. *Bacterial cellulose: properties, production and applications*. *Cellulose: structure and properties, derivatives and industrial uses*. Nova Science Publishers, Inc 2010, 427-458.
- [10] Andrade, F.K.; Silva, J.P.; Carvalho, M.; Castanheira, E.M.; Soares, R.; Gama, M. *Studies on the hemocompatibility of bacterial cellulose*. *J Biomed Mater Res A* 2011, 98(4): 554-66.
- [11] Leitão, A.; Silva, J.; Dourado, F.; Gama, M. *Production and Characterization of a New Bacterial Cellulose/Poly(Vinyl Alcohol) Nanocomposite*. *Materials* 2013, 6(5): 1956-1966.
- [12] Leitão, A.F.; Gupta, S.; Silva, J.P.; Reviakine, I.; Gama, M. *Hemocompatibility study of a bacterial cellulose/polyvinyl alcohol nanocomposite*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013, 111(0): 493-502.
- [13] Czaja, W.; Krystynowicz, A.; Bielecki, S.; Brown Jr, R.M. *Microbial cellulose—the natural power to heal wounds*. *Biomaterials* 2006, 27(2): 145-151.
- [14] Klemm, D.; Schumann, D.; Udhardt, U.; Marsch, S. *Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery*. *Progress in Polymer Science* 2001, 26(9): 1561-1603.
- [15] Kumar, V.A.; Caves, J.M.; Haller, C.A.; Dai, E.; Li, L.; Grainger, S.; Chai-kof, E.L. *Acellular Vascular Grafts Generated from Collagen and Elastin Analogues*. *Acta Biomaterialia* 2013, 0):
- [16] Amarnath, L.P.; Srinivas, A.; Ramamurthi, A. *In vitro hemocompatibility testing of UV-modified hyaluronan hydrogels*. *Biomaterials* 2006, 27(8): 1416-24.
- [17] Aytemiz, D.; Sakiyama, W.; Suzuki, Y.; Nakaizumi, N.; Tanaka, R.; Ogawa, Y.; Takagi, Y.; Nakazawa, Y.; Asakura, T. *Small-Diameter Silk Vascular Grafts (3 mm Diameter) with a Double-Raschel Knitted Silk Tube Coated with Silk Fibroin Sponge*. *Advanced healthcare materials* 2012,
- [18] de Valence, S.; Tille, J.C.; Mugnai, D.; Mrowczynski, W.; Gurny, R.; Moller, M.; Walpoth, B.H. *Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model*. *Biomaterials* 2012, 33(1): 38-47.



Bringing genes to life



nzytech


genes & enzymes

NZYTech is an R&D biotech company that develops a large range of solutions for molecular biology.

Visit our website (www.nzytech.com) to know the products & services we market.

Try NZYTech premium high-throughput services:

- gene synthesis
- gene cloning



Venomics

Venomics, a FP7 project dedicated to the exploration of biodiversity for public health, in which NZYTech is the leader in Molecular Biology. www.venomics.eu

Desenvolvimento de novos biomateriais para aplicação na área da medicina regenerativa

Ilídio J. Correia

CICS-UBI - Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

E-mail: icorreia@ubi.pt

A procura incansável do Homem por uma melhor qualidade e uma maior esperança média de vida, tem despoletado a necessidade de encontrar alternativas para o tratamento de tecidos destruídos por acidentes ou doenças. A Engenharia de Tecidos que é uma ciência interdisciplinar que aplica conhecimentos de diferentes áreas como sejam a Biologia, Engenharia e Medicina tem procurado desenvolver novos suportes tridimensionais (3D) capazes de guiar as células e desta forma permitir a regeneração ou criação de tecidos ou órgãos completamente funcionais. A produção de suportes bioativos constitui um desafio para a comunidade científica, não só em termos de métodos de concepção, mas também na selecção de materiais, naturais ou sintéticos, de forma a evitar problemas de disponibilidade ou de ética.

O grupo de investigação em Biotecnologia e Ciências Biomoleculares: Biomateriais e Engenharia de Tecidos do Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI) tem vindo a desenvolver, ao longo dos últimos anos, hidrogéis, estruturas 3D (scaffolds) e veículos à nanoescala que, futuramente, possam ser usados em diferentes áreas da Medicina regenerativa.

Os hidrogéis são caracterizados por possuírem uma rede polimérica altamente hidrofílica com uma estrutura 3D porosa muito semelhante à matriz extracelular. Estas características estruturais possibilitam a internalização e proliferação das células no seu interior, a difusão de gases, nutrientes e resíduos. Recentemente têm sido desenvolvidos e caracterizados novos hidrogéis que respondem a estímulos externos (como sejam o pH, fotoativação, temperatura, etc) para serem aplicados na área de engenharia de tecidos.

A ocorrência de uma lesão cutânea constitui um acontecimento traumático que leva muitas vezes ao aumento da perda de fluidos, infecção, à formação de cicatrizes e mesmo ao aparecimento de regiões imunocomprometidas. A perda da integridade da pele pode resultar em desequilíbrios fisiológicos ou até, em último caso, na morte do paciente. As funcionalidades da pele devem ser restauradas o mais rapidamente possível, de forma a manter a homeostase. Os investigadores, de diferentes áreas, têm procurado desenvolver novos substitutos de pele que permitam acelerar o processo de cicatrização. Atualmente, apesar de já existirem muitos substitutos de pele disponíveis no mercado (Apligraf, Dermagraft, Epicel, Integra, etc), ainda não existe nenhum que promova o restabelecimento da estrutura nativa da pele, na sua totalidade. O grupo de investigação do CICS-UBI desen-

volveu recentemente hidrogéis à base de biopolímeros como o quitosano e o dextrano, com o intuito de serem usados no tratamento de lesões cutâneas [1,2]. Os resultados obtidos nos estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciaram que estes biomateriais são biocompatíveis, biodegradáveis, possuem capacidade de hidratação da ferida, propriedades antimicrobianas e contribuem para acelerar o processo de cicatrização das feridas (figura 1).

À semelhança da pele, também o tecido ósseo desempenha

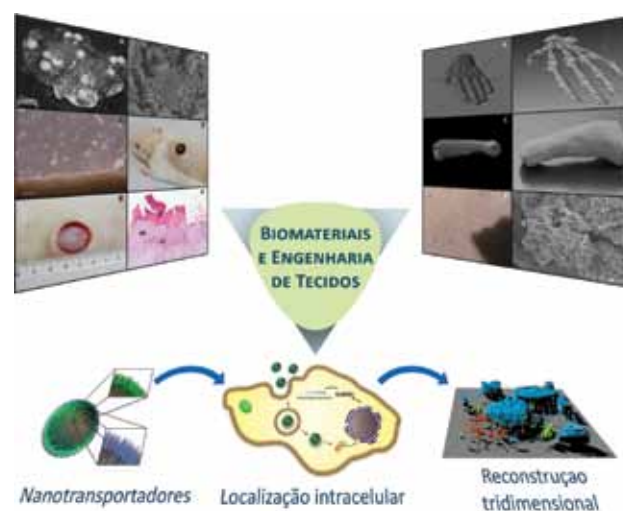


Figura 1 – Representação das três principais áreas de investigação desenvolvidas pelo grupo de investigação em Biomateriais e Engenharia de Tecidos do CICS-UBI.

várias funções no corpo humano, destacando-se a locomoção, proteção dos órgãos internos, reserva de cálcio e sustentação. Este tecido tem a capacidade de se auto-regenerar, contudo, quando os defeitos ósseos são extensos, devido à ocorrência de fraturas ou doença, são necessários tratamentos clínicos dispendiosos e nem sempre eficazes. As patologias que afetam este tecido representam um grave problema para a saúde, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Nos últimos anos, este grupo de investigação produziu por técnicas de prototipagem rápida diferentes suportes 3D contendo alginato, β -Tricálcio fosfato ou hidroxiapatite. Como modelo para a construção destas estruturas 3D foram usados dados de Tomografia Computorizada, obtidos em exames de rotina realizados por pacientes no Centro Hospitalar Cova da Beira. Estes *scaffolds* com as dimensões exatas do defeito ósseo poderão ser usadas na reparação/regeneração deste tecido [3,4].

Outras doenças como o cancro, infecto-contagiosas ou originadas por anomalias genéticas que, na atualidade, são consideradas incuráveis, têm impulsionado a investigação na área da Nanotecnologia. O desenvolvimento de novos equipamentos que permitem manipular a matéria na escala nanométrica, tem contribuído para a conceção e produção de novos nanoveículos (dendrimeros, micelas, nanopartículas, etc) que efetuem a entrega de moléculas biologicamente ativas, como drogas e ácidos nucleicos, em células disfuncionais. Neste contexto, este grupo de investigação tem desenvolvido nanopartículas poliméricas [5,6] e suportes micelares [7] que são capazes de “entregar” de uma forma específica, múltiplas drogas a células cancerígenas. Em colaboração com outros grupos de investigação nacionais e internacionais temos ainda testado outros nano-transportadores, nomeadamente dendrimeros, na “entrega” direcionada e controlada de fármacos [8].

Num futuro próximo esperamos que os resultados obtidos possam ter impacto na indústria farmacêutica e acima de tudo, no bem estar da população em geral.

Agradecimentos

Agradeço a todos os estudantes e colaboradores que contribuíram para os estudos mencionados. Estes trabalhos foram suportados financeiramente pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PTDC/EME-TME/103375/2008, PTDC/EBB-

BIO/114320/2009, PEst-C/SAU/UI0709/2011 e PEst-OE/EGE/UI4056/2011 COMPETE).

Referências

- [1] Ribeiro *et al.*, *Development of a New Chitosan Hydrogel for Wound Dressing*. Wound Repair and Regeneration, 2009. 17: p. 817-24.
- [2] Ribeiro *et al.*, *Dextran based-hydrogel containing chitosan microparticles loaded with growth factors to be used in wound healing*, Materials Science and Engineering C, 2013. 33(5): p. 2958-66.
- [3] Santos *et al.*, *Design and production of sintered β -tricalcium phosphate 3D scaffolds for bone tissue regeneration*. Materials Science and Engineering C, 2012. 32(5): p. 1293-1298.
- [4] Torres *et al.*, *Bioactive Polymeric-Ceramic Hybrid 3D Scaffold for Application in Bone Tissue Regeneration*. Materials Science and Engineering C, 2013. 33: p. 4460-69.
- [5] Gaspar *et al.*, *Nanoparticle mediated delivery of pure P53 supercoiled plasmid DNA for gene therapy*. Journal of Control Release, 2011. 156: p. 212-22.
- [6] Gaspar *et al.*, *Biofunctionalized Nanoparticles with pH-responsive and Cell Penetrating Blocks for Gene Delivery*. Nanotechnology, 2013. 24(27): p. 275101.
- [7] Marques *et al.*, *Synthesis and Characterization of Micelles as carriers of Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) for application in breast cancer therapy*. Colloids and Surfaces B Biointerfaces. 2013, in press.
- [8] Restani *et al.*, *Biocompatible Polyurea Dendrimers with pH-Dependent Fluorescence*. Angew. Chem. Int. Ed.. 2012, 51(21): p. 5162-5.

JUPITER

A Paralab apresenta o Fermentador/ Bio-reactor autoclavável Jupiter da SOLARIS.
Damos-lhe 10 razões para investir num sistema Jupiter:



1. Inclui de base um MFC, com possibilidade de mistura até 5 gases
2. PC touchscreen 18,5" integrado
3. Software SCADA Leonardo, para gestão automatizada dos processos de fermentação
4. Permite o controlo de 4 vasos com o mesmo controlador
5. Acesso remoto ao equipamento para assistência pós-venda
6. Sistema compacto e elegante
7. Controlo de peso através de células de carga (opcionalmente)
8. Escolha variada de sensores: pH, OD polarográfico ou óptico, RedOx, espuma, turvação, CO₂, etc..
9. Sensores com ligação analógica tradicional ou digital com análise de diagnóstico
10. Motores de agitação sem escovas



paralab

Contactos:

Sede: Tv. Do Calvário, 65, Giesta | 4420-392 Valbom Gondomar | Tef: 224 664 320 | Fax: 224 664 321
Delg. Sul: R. Antero de Quental, 5B-S 9 | 2795-017 Linda-a-Velha | Tef: 214 177 207 | Fax: 214 177 208

www.paralab.pt | info@paralab.pt

Abordagens de biologia sintética para o diagnóstico e tratamento do cancro

Lígia R. Rodrigues

IBB – Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

E-mail: lrmr@deb.uminho.pt

O cancro é um problema de saúde pública representando uma das principais causas de morte a nível mundial [1]. Estimam-se cerca de 13.1 milhões de mortes relacionadas com cancro em 2030, sendo que 0.8 milhões corresponderão a cancro da mama. Neste sentido, qualquer progresso científico que permita melhorar o diagnóstico e tratamento do cancro constitui uma prioridade global. As estratégias que têm vindo a ser desenvolvidas ao longo dos anos incluem a procura de novos biomarcadores, agentes terapêuticos ou tratamentos [2]. As abordagens de biologia sintética apresentam várias possibilidades de melhorar os meios de diagnóstico e terapias existentes, bem como potencial para o desenvolvimento de novas soluções que ainda não tenham sido previstas [3].

A biologia sintética consiste na utilização de princípios de engenharia para criar, de forma racional e sistemática, sistemas funcionais com base nas máquinas moleculares e circuitos de regulação dos organismos vivos ou re-desenhar e fabricar sistemas biológicos existentes. O foco da biologia sintética consiste frequentemente em transportar partes de sistemas biológicos naturais, caracterizá-los e simplificá-los, e posteriormente utilizá-los como componentes de um sistema biológico artificialmente construído [4].

Tradicionalmente, a maioria das drogas têm sido geradas a partir de compostos obtidos de produtos naturais [5]. No entanto, os avanços na sequenciação genética juntamente com a possível manipulação de vias biossintéticas, constituem recursos importantes para a seleção e conceção de novos agentes terapêuticos [6]. Adicionalmente, o desenvolvimento de abordagens racionais através do uso da bioinformática para integração de dados permite a compreensão dos mecanismos subjacentes ao efeito anti-cancerígeno desses mesmos agentes [7]. A biologia sintética pode ainda desempenhar um papel crucial no desenvolvimento de novos sistemas de libertação controlada de drogas dirigidos para alvos específicos. As células podem ser manipuladas para reconhecer alvos específicos ou condições no corpo humano que não são naturalmente reconhecidas pelo sistema imunitário [8].

Futuras e promissoras aplicações incluem o desenvolvimento de biossensores com base em aptâmeros para produzir uma resposta desejada *in vivo* ou para serem integrados num dispositivo de diagnóstico de cancro; o desenho e manipulação de bactérias que podem ser programados para especificamente reconhecer um tumor e libertar um agente terapêutico *in situ*; a produção em grande escala de agentes quimioterapêuticos complexos, entre outros.

Actualmente no Centro de Engenharia Biológica (CEB) da Universidade do Minho estão a ser usadas estratégias de biologia sintética no desenvolvimento de novas soluções para o diagnóstico e tratamento do cancro. A investigação em curso inclui a seleção e otimização de aptâmeros para o reconhecimento e tratamento do cancro da mama; desenho de aptasensores para a deteção do cancro da mama; desenho e construção de bactérias para o tratamento de cancro de mama; e construção de vias biossintéticas artificiais em bactérias para a produção de agentes anti-cancerígenos.

Aptâmeros para o diagnóstico e tratamento de cancro de mama

Os aptâmeros, ácidos nucleicos de cadeia simples sujeitos a um processo de evolução, podem reconhecer especificamente e ligar-se firmemente a uma grande variedade de alvos [9] (Fig.1). São obtidos pela metodologia SELEX, que se baseia no seu enriquecimento numa biblioteca inicial de sequências aleatórias de ADN ou ARN quando incubada com o alvo (e.g. células cancerosas).

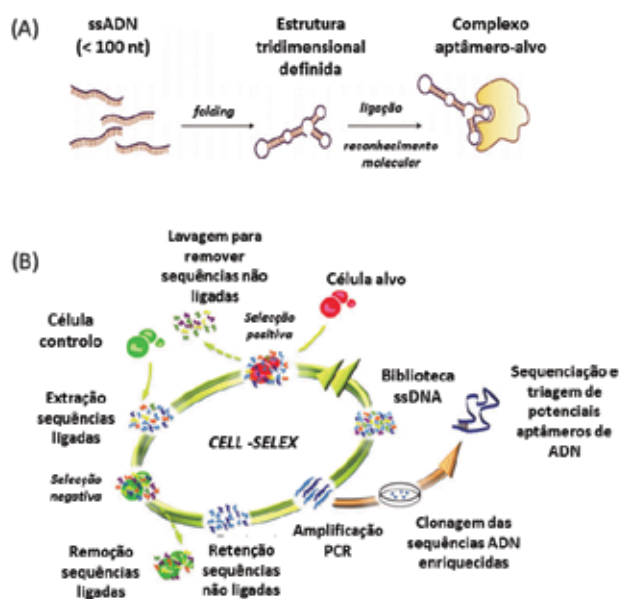


Figura 1 – Representação esquemática da funcionalidade de um aptâmero (A) e da metodologia Cell-SELEX (B).

A sua afinidade é comparável à dos anticorpos, embora possuam muitas outras vantagens: tamanho; produção fácil, rápida e reprodutível; modificação química versátil; eleva-

da estabilidade; baixa imunogeneidade e boa penetração nos tecidos. Alguns aptâmeros têm também sido apontados como possíveis agentes anti-cancerígenos [10]. O uso comercial dos aptâmeros é incipiente, contudo a sua singularidade promete revolucionar a área médica. O projeto em curso pretende gerar aptâmeros contra células de cancro da mama, e usá-los para desenhar nanopartículas multivalentes que reconheçam e internalizem o tumor libertando agentes terapêuticos. Aptâmeros que reconheçam especificamente as células de cancro da mama serão selecionados para melhorar o reconhecimento do tumor. O tamanho pequeno dos aptâmeros permite o seu acesso a alvos que não se encontram prontamente expostos na superfície da célula. A sua ligação a partículas contendo agentes ativos vai dirigí-las para esses locais permitindo um aumento da concentração intratumoral de agentes ativos. Os aptâmeros podem ser modificados para melhorar as suas características ou conferir-lhes novas (fluorescência) [9]. Neste sentido, estão a ser usadas ferramentas de biologia sintética para modificar os aptâmeros de forma a que possam ser detectados, e possuam melhor capacidade de reconhecimento das células de cancro, resultando em partículas mais robustas.

Aptasensores para a deteção do cancro da mama

O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos com base em aptâmeros (aptasensores) (Fig. 2) tem tornado a deteção de analitos pequenos e macromoleculares mais fácil, rápido e adequado para a deteção precoce de biomarcadores proteicos.

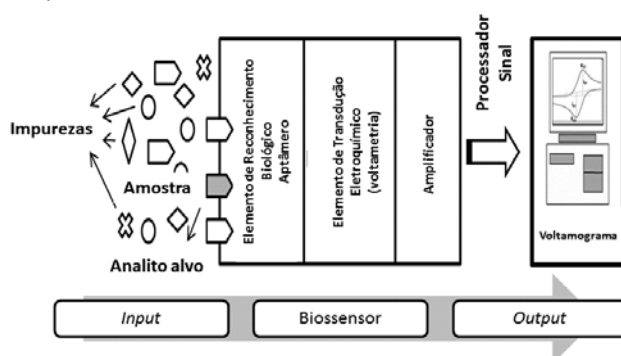


Figura 2 – Representação esquemática de um aptasensor eletroquímico

Os biomarcadores séricos são produzidos por órgãos ou tumores e revelam a presença de antígenos na superfície das células. Quando detetados em grandes quantidades nos fluidos biológicos, podem ser indicativos de atividade tumoral. O projeto em curso pretende desenvolver um multi-aptasensor eletroquímico para a deteção de osteopontina (proteína sobreexpressa em tumores da mama [2]) em fluidos biológicos. Como elementos de reconhecimento biológico estão a ser usados aptâmeros que foram selecionados e otimizados usando estratégias de biologia sintética. O uso dos aptâmeros permitirá aumentar a especificidade e seletividade do sensor para a osteopontina.

Desenho e construção de bactérias para o tratamento do cancro da mama

As bactérias possuem características únicas e poderosas que podem ser exploradas no tratamento do cancro de formas inatingíveis por métodos convencionais. O sucesso moderado dos métodos convencionais (quimioterapia e radiação) prende-se com a sua toxicidade para o tecido normal e a sua incapacidade para destruir todas as células cancerosas. Muitas bactérias têm sido reportadas pela sua capacidade de reconhecer especificamente tumores, de penetrar activamente o tecido, de ser facilmente detetadas e/ou de induzir uma citotoxicidade controlada. Usando abordagens de biologia sintética é possível desenhar interações entre bactérias geneticamente manipuladas e células de mamíferos abrindo inúmeras possibilidades de progresso no tratamento do cancro. No âmbito do projeto SYNBIODACTHER, está a ser construída uma bactéria com capacidade de desencadear a síntese de um agente terapêutico *in situ* em resposta ao calor. A ideia é que a mesma possa ser usada simultaneamente com o tratamento de ultra-sons para o tratamento de cancro da mama, potenciando o efeito do agente terapêutico *in situ*.

Construção de uma via biossintética artificial para a produção de agentes anti-cancerígenos

As abordagens de biologia sintética podem ainda ser utilizadas para desenvolver processos de produção em larga escala de agentes terapêuticos. Uma das estratégias usadas para construir vias biossintéticas artificiais consiste na combinação de genes de organismos diferentes e na criação de um novo conjunto de vias metabólicas para a produção de vários produtos naturais e não naturais. O exemplo mais conhecido consiste na construção de uma via metabólica artificial de produção do precursor da artemisinina (droga anti-malária) numa bactéria, permitindo a sua produção em grandes quantidades com uma diminuição significativa do tempo e os custos de produção [11]. O projeto em curso no CEB pretende construir uma nova via biossintética numa bactéria para a produção de compostos aromáticos naturais em plantas. A chave para esta abordagem consiste na especificação de sequências de genes que codificam enzimas que catalisam cada reação na via, e cujas sequências de ADN podem ser incorporadas em dispositivos que conduzem à expressão funcional das moléculas de interesse [12]. Partes específicas da via foram recrutadas a partir de fontes independentes e co-localizadas num único hospedeiro.

Apesar de todos os avanços científicos a que a humanidade tem assistido ao longo dos últimos séculos, ainda não há soluções claras e definitivas para eliminar o cancro. Neste sentido, a busca de soluções inovadoras e eficientes continua a conduzir a investigação e o investimento nesta área de conhecimento. Os avanços recentes proporcionados pelas abordagens de biologia sintética são promissores, embora alguns ainda longe de uma aplicação real devido a desafios

técnicos e questões éticas. No entanto, espera-se que este tipo de soluções inovadoras venha a revolucionar a área do diagnóstico e tratamento do cancro.

Referências

- [1] Siegel R, Naishadham, D, Jemal A (2013) Cancer Statistics, 2013. CA Cancer J Clin 63:11-30.
- [2] Rodrigues LR, Teixeira JA, Schmitt F, Paulsson M, Lindmark Måsson H (2007) The role of osteopontin in tumour progression and metastasis in breast cancer. Cancer Epidemiol Biom Prev 16: 1087–1097
- [3] Rodrigues LR, Kluskens L. Synthetic Biology & Bioinformatics: Prospects in the cancer arena. In H.S. Lopes; L.M. Cruz (eds), Computational Biology and Applied Bioinformatics 8, pp. 159-186, InTech, Rijeka, Croatia, 2011 (ISBN: 978-953-307-629-4)
- [4] Endy D (2005) Foundations for engineering biology. Nature 438:449-453
- [5] Neumann H, Neumann-Staubitz P (2010) Synthetic biology approaches in drug discovery and pharmaceutical biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol 87: 75-86
- [6] Carothers JM, Goler JA, Keasling JD (2009) Chemical synthesis using synthetic biology. Curr Opin Biotechnol 20: 498-503
- [7] Leonard E, Nielsen D, Solomon K, Prather KJ (2008) Engineering microbes with synthetic biology frameworks. Trends Biotechnol 26 (12): 674-681
- [8] Forbes NS (2010) Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. Nat Rev Cancer 10: 785-794
- [9] Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B (2007) SELEX – A (r)evolutionary method to generate high affinity nucleic acid ligands. Biomol Eng 24: 381-403
- [10] Zhou J, Rossi JJ (2009) The therapeutic potential of cell-internalizing aptamers. Curr Topics Med Chem 9(12):1144-1157
- [11] Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling JD (2003) Engineering a mevalonate pathway in Escherichia coli for production of terpenoids. Nat Biotechnol 21:796–802
- [12] Prather K, Martin CH (2008) De novo biosynthetic pathways: rational design of microbial chemical factories. Curr Opin Biotechnol 19: 468–474

C
O
N
G
R
E
S
S
O
S

3rd Euro-Mediterranean Conference on Natural Products: From BioTechnology to NanoMedicine (BioNat-III)
4-6 January 2014, Cairo, Egypt | <http://www.bionats.org/>

2014 International Conference on Chemical and Bioprocess Engineering (ICCB E 2014)
24-25 January 2014, Macau | <http://www.iccbe.net/>

International Conference on Biological, Chemical and Environmental Sciences (BCES-2014)
21-22 January 2014, Patong Beach, Phuket (Thailand) | <http://www.icbe.org/2014/01/21/36>

Biology of RNA in host-pathogen interactions
26-29 January 2014, Tenerife, Canary Islands, Spain | http://bioinfogp.cnb.csic.es/RNA_host_pathogen_2014/

3rd Biotechnology World Congress
10-12 February 2014, Dubai, UAE | <http://www.biotechworldcongress.com/index.php>

Lab-on-a-Chip European Congress
10-11 March 2014, Berlin, Germany | <http://selectbiosciences.com/conferences/index.aspx?conf=LOACEC2014>

12th European Conference on Fungal Genetics
23-27 March 2014, Seville, Spain | 2014. <http://www.ecfgl2.com/cgi.hrb?idexp=EAXQ5&main=home>

36th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals
April 28 – May 1 2014 | <http://www.simbhq.org/sbfc/>

11th Annual World Congress on Industrial Biotechnology
12-15 May 2014, Philadelphia, USA | <http://www.bio.org/events/conferences/world-congress>

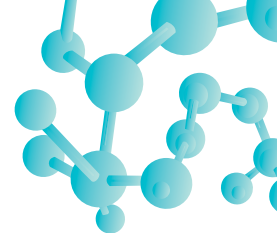
European Biotechnology Congress 2014
15-18 May 2014, Lecce, Italy | <http://www.eurobiotech2014.eu/>

22nd European Biomass Conference and Exhibition
23-26 June 2014, Hamburg, Germany | <http://www.eubce.com/>

Recovery of Biological Products Conference XVI
27-31 July 2014, Rostock, Germany | <http://recoveryconferences.org/>

10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences and 6th International Forum on Industrial Bioprocesses
7-10 September 2014, Lille, France | <http://esbes-ifiop-lille2014.com/>

2
0
1
4



Sistemas de cultura 3D para diferenciação neural de células estaminais humanas

Daniel Simão, Catarina Pinto, Margarida Serra, Catarina Brito, Paula M. Alves

iBET – Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Oeiras, Portugal

ITQB-UNL – Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal

E-mail: anabrito@itqb.unl.pt

Nas últimas décadas, a falta de modelos adequados do sistema nervoso central (SNC) tem travado avanços no conhecimento básico de doenças neurodegenerativas, nomeadamente, ao nível dos mecanismos moleculares que estão na base do seu aparecimento e progressão. Adicionalmente, apenas cerca de 8% dos novos fármacos aprovados em ensaios pré-clínicos para o tratamento de patologias do SNC chegam ao mercado [1], tornando-se evidente a necessidade de desenvolver metodologias mais eficientes e precisas na identificação e avaliação de novos compostos. Os modelos animais tradicionalmente utilizados, tanto por indução química como por manipulação genética, não permitem recapitular de forma precisa as principais características destas patologias, em grande parte devido às diferenças entre as espécies [2]. Este tipo de modelos apresenta ainda uma grande desvantagem do ponto de vista da indústria farmacêutica, por não ser possível a sua aplicação em plataformas de “high-throughput”. Estas plataformas permitem testar centenas a milhares de compostos em paralelo de forma a identificar e seleccionar rapidamente os mais promissores, reduzindo os custos e duração dos ensaios clínicos. Desta forma, o desenvolvimento de novos modelos celulares humanos que mimetizem o cérebro humano e patologias associadas de forma mais precisa tem ganho crescente relevância junto da comunidade científica e indústria. Recentemente, foram feitos importantes avanços no desenvolvimento destes modelos, nomeadamente no que respeita à diversidade de fontes celulares (linhas celulares imortalizadas, células estaminais embrionárias ou adultas e células estaminais pluripotentes induzidas) assim como os métodos de diferenciação disponíveis [2].

A diferenciação de células estaminais é um processo altamente regulado, onde é feita a integração de vários sinais externos, tais como a disponibilidade de nutrientes ou factores de crescimento; o stress mecânico induzido pelo sistema de cultura; as interações célula-célula e célula-matriz extracelular; etc [3,4]. Tendo como objectivo mimetizar *in vitro* as características de tecidos humanos, tal como o cérebro, é fundamental ter em conta a organização celular tridimensional (3D) do tecido em estudo. Esta configuração 3D terá um impacto directo na activação e direccionamento das vias de diferenciação e funcionalidade celular, conferindo uma maior similaridade entre o modelo e o tecido *in vivo* [5]. Desta forma, diversos sistemas de cultura foram

desenvolvidos com o propósito de conferir um maior nível de complexidade espacial aos modelos celulares, em relação às tradicionais culturas em monocamada de células. Entre os sistemas mais utilizados encontram-se as culturas organotípicas e as culturas *in vitro* 3D. As culturas organotípicas consistem na manutenção de secções finas de tecido derivado de um explante, permitindo manter a arquitectura e especificidade do tecido original. No entanto, têm uma aplicabilidade reduzida uma vez que não podem ser mantidas a longo prazo nem são compatíveis com plataformas “high-throughput”. Relativamente às culturas *in vitro* 3D, uma das estratégias possíveis passa pela encapsulação das células em matrizes que vão conferir a tridimensionalidade à cultura [5]. Estas estratégias baseiam-se nas propriedades específicas de diversos polímeros naturais (colagénio, quitosano, ácido hialurónico, alginato, etc) ou biomateriais sintéticos (PGA, PLA, PCL, etc), assim como em diferentes processos para fabricar estes suportes [6]. No entanto, estes processos de diferenciação tornam-se dependentes do desenvolvimento e preparação dos suportes e matrizes 3D, o que na maioria dos casos se traduz em processos bastante morosos. Por outro lado, a escolha dos materiais a utilizar pode também revelar-se crítica nestes processos. Os materiais sintéticos apesar de completamente definidos em termos de composição, na sua maioria não apresentam domínios de ligação e reconhecimento celular impossibilitando interacções célula-matriz. Já os materiais de origem natural têm como principal vantagem permitir as interacções celulares com a matriz, através da presença natural de domínios de adesão celular. No entanto a sua composição pode incluir substâncias não quantificáveis e variáveis entre lotes, contribuindo para uma elevada variabilidade nos resultados obtidos e falta de reprodutibilidade [7].

Explorando a capacidade que muitos tipos de células apresentam de se auto-organizarem em agregados celulares é possível formar estruturas 3D, tipicamente denominados por esferóides ou, no caso específico de linhagens neurais, neuroesferas. Estes não necessitam de suporte externo, já que as células secretam a sua própria matriz extracelular [4]. Diferentes métodos foram desenvolvidos para permitir e induzir a agregação celular em esferóides, incluindo metodologias de gotas suspensas; agregação espontânea em sistema de cultura estático; ou agregação induzida em sistemas agitados [4]. Uma vez que a origem e composição da matriz extracel-

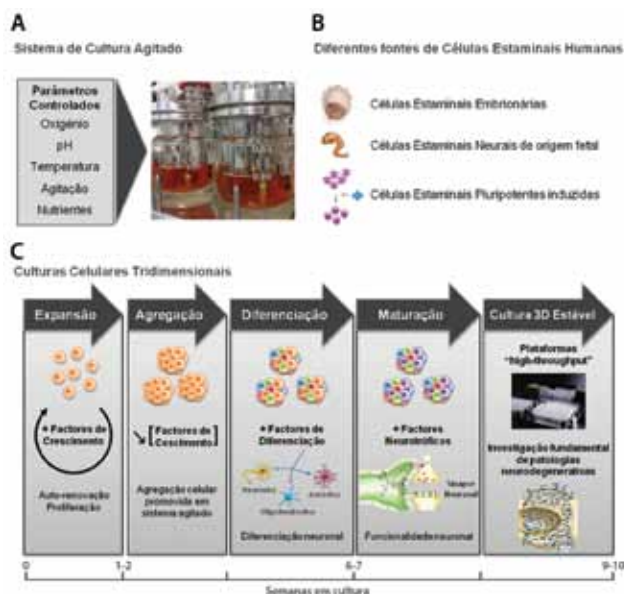


Figura 1 – Estratégia de diferenciação neural 3D em sistema de cultura dinâmico. (A) A utilização de bioreactores de tanque agitado permite a monitorização e controlo dos principais parâmetros da cultura. (B) Esta estratégia permite a sua adaptação e optimização tendo em conta a diversidade de opções de origens de células estaminais humanas disponíveis. (C) O processo de diferenciação 3D envolve etapas sequenciais (expansão, agregação, diferenciação e maturação) onde a composição do meio se apresenta como a variável chave, com a adição e remoção de factores de crescimento, diferenciação e neurotróficos.

lular é exclusivamente derivada da biossíntese celular, estes esferóides apresentam-se como um excelente modelo para o estudo da homeostase desta mesma matriz ao longo dos processos de diferenciação. Os processos de regulação da composição da matriz extracelular têm um papel preponderante durante o desenvolvimento de órgãos e tecidos, sendo que em caso de desregulação, levam a alterações patológicas, tais como formação de tumores ou doenças neurodegenerativas [8]. Assim sendo, o elevado potencial demonstrado por estes modelos celulares 3D poderá permitir diminuir a dependência sobre a utilização de modelos animais, apresentando-se como uma alternativa complementar tanto para a investigação como para a indústria. Se considerarmos o crescente número de novas e mais poderosas metodologias que permitem uma caracterização mais detalhada dos sistemas, os modelos celulares 3D humanos poderão contribuir fortemente para o desenvolvimento de ensaios mais precisos para a avaliação e identificação de novos fármacos [4,5]. Os modelos baseados em neuroesferas têm gerado um crescente interesse por parte da comunidade científica, nomeadamente para a investigação pré-clínica de patologias neurodegenerativas, sendo que estudos recentes demonstram que estes modelos permitem recapitular alguns processos fundamentais observados durante o desenvolvimento do sistema nervoso central [9].

Tal como demonstrado pelo nosso grupo [10,11], através da implementação e optimização de bioprocessos em sistemas dinâmicos, controlando os principais parâmetros de cultura (pO_2 , pH, temperatura, agitação e composição do meio de cultura), é possível estabelecer processos robustos de diferenciação neural 3D partindo de células estaminais humanas de diferentes origens. Desta forma, estratégias têm sido seguidas, que passam não só pela exploração das vantagens do sistema de cultura agitado, mas também pelo estabeleci-

mento de um processo de diferenciação com diferentes fases, onde a composição do meio de cultura desempenha um papel fundamental através da adição ou remoção de diferentes factores e citocinas (Fig.1). Assim, a exposição sequencial a factores de crescimento, de diferenciação e neurotróficos, permite induzir de forma eficiente fases distintas no processo de diferenciação: (i) expansão celular, que permite obter um elevado número de células através do estímulo via factores de crescimento; (ii) agregação, onde a organização celular em neuroesferas é induzida pelo sistema de cultura agitado e a diminuição da concentração de factores de crescimento permite iniciar os programas de diferenciação celular; (iii) diferenciação, que permite induzir e direccionar os programas de diferenciação para as várias linhagens neurais - neurónios, astrócitos e oligodendrócitos, através da adição de factores de diferenciação específicos; (iv) maturação, onde os factores de diferenciação são removidos e são adicionados factores neurotróficos que permitem manter a viabilidade celular assim como estimular a maturação funcional de for-

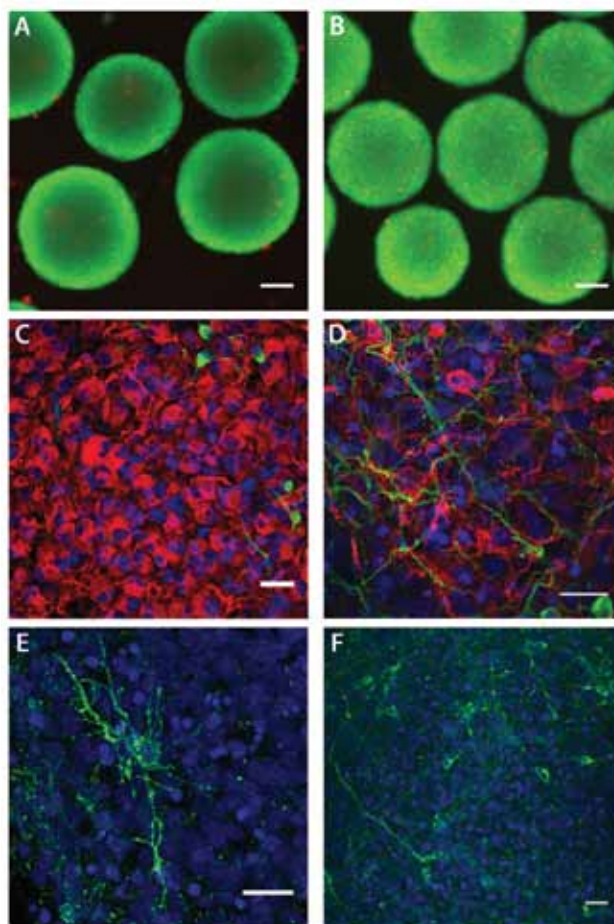


Figura 2 – Diferenciação em neuroesferas de células estaminais neurais humanas derivadas do mesencéfalo. (A, B) As neuroesferas mantêm elevada viabilidade celular no início (A) e no final (B) do processo de diferenciação (células verdes – viáveis; células vermelhas – não viáveis). (C) Imediatamente após a organização celular em neuroesfera, estas apresentam na sua maioria células ainda não diferenciadas (vermelho – nestina) e reduzido número de neurónios (verde – β III-tubulina). (D,E) Através do processo de diferenciação e maturação as neuroesferas alteram a sua composição celular apresentando uma densa rede de neurónios e astrócitos (D) (verde – β III-tubulina; vermelho – GFAP; azul – núcleos) observando-se ainda a presença de oligodendrócitos (E) (verde – O4; azul – núcleos). (F) Devido à origem mesencefálica destas células a diferenciação neuronal leva maioritariamente à geração de neurónios dopaminérgicos (verde – tirosina hidroxilase; azul - núcleos). As barras de escala correspondem a 20 μ m.

MACHEREY-NAGEL

Introducing the new NucleoSpin Plasmid EasyPure!
Now with 35% of discount!

And for the rest of products now 20% of discount!



NucleoSpin® Plasmid

- Up to 10 ml bacterial overnight culture yield up to 40 µg plasmid DNA.
- Rapid small scale preparation of sequencing grade plasmid DNA.

NucleoSpin® Plasmid NoLid

- Now also columns without lid available.

NucleoSpin Plasmid EasyPure

- Ultra-fast small scale preparation of up to 35 µg high-purity plasmid DNA at an unbeatable price.



NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

- **Two-in-one kit:** PCR Clean-up and gel extraction.
- Small elution volumes (15 µl) results in highly concentrated DNA.
- Highest recoveries even for very small fragments (> 50 bp).



NucleoBond® XtraMidi yMaxi (Plus)

- **New generation of anion exchangers** for transfection grade plasmid Midi/Maxi preps!
- Up to 60% reduced prep time with perfect purity.
- More than 100% increased yields.
- Now also for endotoxin-free plasmid DNA.

OFFER!

With the order of some kits (see table) from the promotion, we offer a timer (Ref. 15191937) totally free of Charge! (include the code of the timer in your order)



NucleoSpin® Tissue

- **The all-round kit for the isolation of genomic DNA** from a wide range of different starting tissues.
- Highly sensitive membrane allows reliable purification of even trace amounts of DNA.

NucleoSpin® Blood

- **gDNA extraction from several types of blood samples** (human, animal, fresh, frozen, treated with EDTA, citrate or heparin).
- Typical yield of 4-6 µg per 200 µl blood sample.



NucleoSpin® RNA II

- **High yields and purities from cells and tissue** for a favorable price.
- Prefilters for sample homogenization and rDNase for on column digestion included.

NucleoSpin® miRNA

- **Superior selectivity:** Purification of RNA fractionated by size.
- Additional isolation of total protein ready to use for SDS Page or Western Blot.



NucleoSpin® Plant II

- **Two alternative lysis buffers included** for optimal processing of various samples.
- Easy protocol for processing up to 100 mg (wet weight) plant material.
- NucleoSpin Filters for easy lysate clarification included.
- Optimal RNA removal by RNase A digestion (enzyme included).



Fisher Scientific, Lda
Telephone: +351 21 425 33 50/4
Fax: +351 21 425 33 51
www.thermofisher.com



ma a que os neurónios e astrócitos adquiram as suas típicas características funcionais.

A diferenciação *in vitro* de células estaminais neurais isoladas do mesencéfalo fetal permite obter um modelo celular com um forte carácter dopaminérgico, característico do tecido de origem [12]. Assim, estas células tornam-se um interessante modelo para o estudo e desenvolvimento de novas terapias para a doença de Parkinson, caracterizada por uma perda progressiva de neurónios dopaminérgicos. Estas células proliferam de forma robusta em condições de baixos níveis de oxigénio e sem adição de soro de origem animal, mantendo a sua capacidade multipotente e originando, após a diferenciação, células das três linhagens neurais. Assim, tal como reportado pelo nosso grupo [11] é possível obter neuroesferas diferenciadas com elevada viabilidade celular, através da sua diferenciação 3D em sistema de cultura agitado, (Fig.2 A, B) e compostas por uma rede tridimensional de neurónios, astrócitos e oligodendrócitos (Fig.2 C-E). Relativamente à diferenciação neuronal, devido à identidade mesencefálica destas células, no final do processo é possível obter neurónios que expressam marcadores dopaminérgicos, como a tirosina hidroxilase (Fig.2 F), a enzima limitante na via de biosíntese de dopamina, o que sugere a aquisição de um fenótipo dopaminérgico por parte destas células.

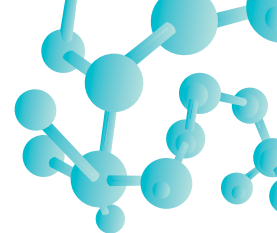
Os modelos 3D neurais humanos poderão no futuro levar a um aumento significativo da relevância biológica e fisiológica, quando comparados com os sistemas tradicionais de cultura em monocamada de células e modelos animais. Estes modelos poderão ser aplicados tanto em estudos mais fundamentais acerca dos mecanismos básicos de patologias humanas, assim como em plataformas de identificação e validação de novos fármacos. A estratégia e metodologia desenvolvida neste trabalho, pode ainda ser aplicada para a diferenciação de células estaminais de múltiplas origens, aumentando assim a sua versatilidade e relevância para a comunidade científica e para a investigação pré-clínica.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. J. Schwarz e à Dra. S. Schwarz (Universidade de Leipzig, Alemanha) por cederem as células estaminais neurais utilizadas no trabalho. Este trabalho foi financiado pela União Europeia através do projecto BrainCAV (FP7-222992) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (PTDC/EBB-BIO/112786/2009 e PTDC/EBB-BIO/119243/2010). D. S. agradece à FCT a bolsa de doutoramento (SFRH/BD/78308/2011).

Referências

- [1] Miller G (2010) Is pharma running out of brainy ideas? *Science* 329: 502–504.
- [2] Schüle B, Pera R a R, Langston JW (2009) Can cellular models revolutionize drug discovery in Parkinson's disease? *Biochim Biophys Acta* 1792: 1043–1051.
- [3] Griffith LG, Swartz M (2006) Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 211–224.
- [4] Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J (2013) Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol* 31: 108–115.
- [5] Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 839–845.
- [6] Carletti E, Motta A, Migliaresi C (2011) Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture. In: Haycock JW, editor. *3D Cell Culture: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, Vol. 695. pp. 17–39.
- [7] Owen SC, Shoichet MS (2010) Design of three-dimensional biomimetic scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part A* 94: 1321–1331.
- [8] Cox TR, Erler JT (2011) Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech* 4: 165–178.
- [9] Moors M, Rockel TD, Abel J, Cline JE, Gassmann K, et al. (2009) Human neurospheres as three-dimensional cellular systems for developmental neurotoxicity testing. *Environ Health Perspect* 117: 1131–1138.
- [10] Serra M, Brito C, Costa EM, Sousa MFQ, Alves PM (2009) Integrating human stem cell expansion and neuronal differentiation in bioreactors. *BMC biotechnology* 9: 82.
- [11] Brito C, Simão D, Costa I, Malpique R, Pereira CI, et al. (2012) 3D cultures of human neural progenitor cells: dopaminergic differentiation and genetic modification. *Methods* 56: 452–460.
- [12] Storch A, Sabolek M, Milosevic J, Schwarz SC, Schwarz J (2004) Mid-brain-derived neural stem cells: from basic science to therapeutic approaches. *Cell Tissue Res* 318: 15–22.



Terapia génica e desafios no desenvolvimento de vectores virais

Paulo Fernandes^{1,2}, Rute Castro^{1,2}, Paula M. Alves^{1,2}, Manuel J.T. Carrondo^{1,3} e Ana S. Coroadinha^{1,2}

¹iBET, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal

²Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, 2780-157 Oeiras, Portugal

³Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa (FCT,UNL), P-2825 Monte da Caparica, Portugal

E-mail: avalente@itqb.unl.pt

Resumo

A terapia génica, o tratamento ou prevenção de doenças através da transferência de material genético, tem vindo a adquirir uma crescente atenção principalmente após os recentes casos de sucesso e à aprovação do 'Alipogene Tiparvovec' na Europa para o tratamento da deficiência em lipoproteína lipase. Os primeiros ensaios clínicos para terapia génica iniciaram-se nos anos 90, no entanto, esta forma de terapia tem avançado muito lentamente, e são ainda poucos os casos que se concretizaram num medicamento comercialmente disponível. A terapia génica recai sobre tecnologias complexas para garantir uma elevada eficiência da transferência do material genético, onde os vectores virais são um dos veículos mais promissores para esse fim. A produção, eficiência e segurança destes vectores são desafios que continuam a ser aperfeiçoados para ir ao encontro das exigências dos ensaios clínicos e da aprovação de novos biofármacos.

Introdução

A terapia génica consiste na introdução de material genético terapêutico nas células do paciente. O material genético leva novas instruções à célula de modo a tratar ou prevenir uma doença. Apesar de algum descrédito devido aos resultados negativos de alguns ensaios clínicos iniciais, os sucessos subsequentes restauraram a confiança no potencial da terapia génica. Estes incluem o tratamento de pacientes com imunodeficiência severa combinada [1], leucemia linfóide [2] ou Parkinson [3]. De facto, em 2012 foi aprovado na Europa o uso clínico de Glybera® (ou Alipogene Tiparvovec), um biofármaco para terapia génica que compensa a deficiência da lipoproteína lipase envolvida na pancreatite aguda. A figura 1A sumariza os vários tipos de doenças para as quais a terapia génica está a ser avaliada em ensaios clínicos.

A cada doença e patologia deve ser adequado um sistema de entrega de material genético apropriado. A transferência de material genético para as células-alvo pode ser feita através de veículos virais, quando se utilizam vírus recombinantes denominados de vectores virais, ou veículos não virais, quando se baseiam na utilização de DNA livre ou complexo com outras moléculas (revisto em [4]).

A entrega directa de DNA livre é normalmente feita através de métodos auxiliares tais como microinjecção, electroporação ou disparo de micropartículas. As restrições na aplicabilidade desta estratégia levaram ao desenvolvimento de vectores para facilitar e aumentar a transferência de material genético. Lipossomas, conjugados DNA-proteína, e conjugados DNA-proteína-vírus defectivo são alguns exemplos de vectores não virais utilizados. Por outro lado, são vários

os vírus adaptados a vectores. Os vectores virais abarcam a maior percentagem dos ensaios clínicos realizados até hoje (Figura 1B), dado que estes apresentam maior eficiência na transferência de material genético.

Vectores virais

O desenvolvimento de vectores virais baseia-se na manipulação do genoma viral de forma a incluir o material genético a ser expresso nas células ou tecido-alvo, impedir a replicação típica dos vírus e remover a sua patogenicidade. Adicionalmente podem ser feitas mais modificações para aumentar a especificidade/tropismo às células alvo, modelar os níveis de expressão do material genético e facilitar a sua manufatura. Os dois vectores virais mais utilizados até hoje em ensaios clínicos são os derivados de Adenovírus e Retrovírus.

Vectores adenovirais

Os vectores adenovirais são candidatos apropriados à entrega de material genético pelas vantagens que apresentam, nomeadamente amplo tropismo celular, incapacidade de se integrarem no genoma das células hospedeiras, alta eficiência em transduzir células-alvo e relativa facilidade em serem produzidos em quantidades significativas e com qualidade superiores a qualquer outro vector viral [5]. Nas duas últimas décadas, o genoma adenoviral foi progressivamente modificado de forma a aumentar a sua segurança e eficácia em cenários terapêuticos. Desde a 1ª geração de vectores, com a eliminação da região de replicação, até à 3ª geração de vectores com a remoção de todos os genes virais, foi alcançada uma capacidade de inserir material genético até 36 kb.

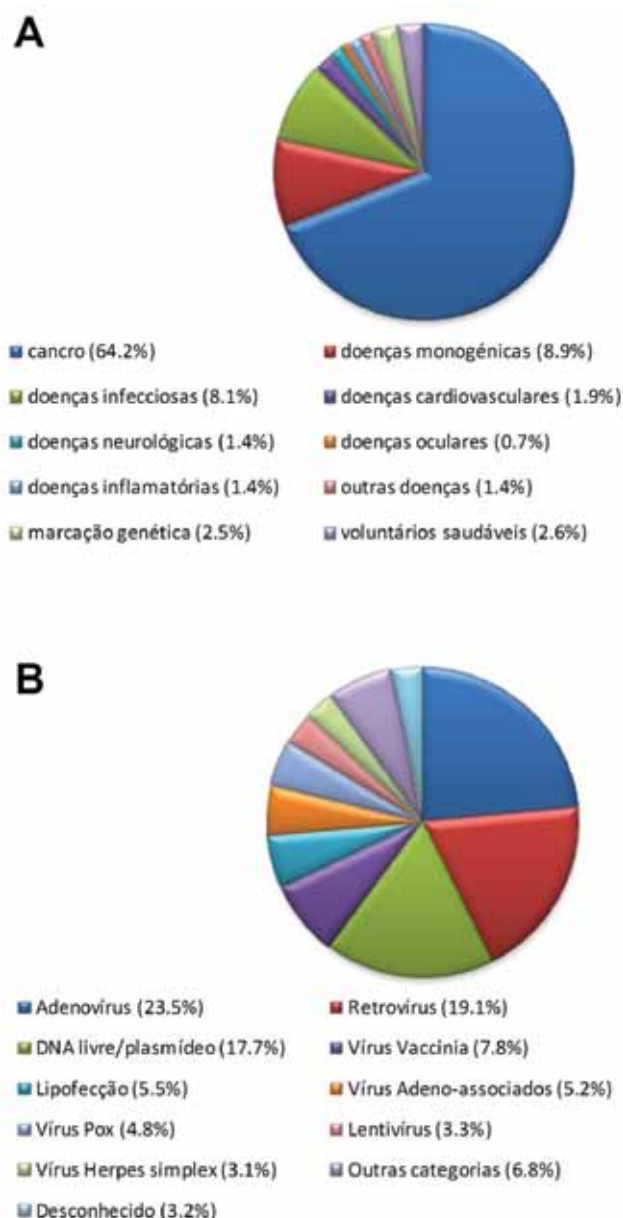


Figura 1 – Indicações (A) e vectores (B) dos ensaios clínicos de terapia génica actualmente em curso (adaptado de <http://www.abedia.com/wiley/>).

Apesar da ampla utilização de vectores derivados de adenovírus humanos tipo 5, a pré-imunidade existente contra estes vírus compromete a entrega do material genético e limita a eficácia da terapia (revisto em [6]). A utilização de vectores adenovirais não humanos, nomeadamente adenovírus caninos do serótipo 2 (CAV-2), constitui umas das estratégias capazes de contornar esta limitação, mantendo todas as vantagens associadas ao uso de vectores adenovirais [6]. De facto, a ausência de resposta imunitária humoral e celular pré-existente contra CAV-2 torna os seus vectores potencialmente mais seguros e aplicáveis em situações onde a expressão a longo prazo do gene terapêutico é mandatória. Além disso, dada a sua grande capacidade de transdução de neurónios, estes vectores são tidos como ferramentas ideais para estudar distúrbios neurodegenerativos. Por isso são vários os estudos que envolvem vectores de CAV-2 na transferência de genes em neurónios, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Como consequência da eliminação de genes virais essenciais à progressão do ciclo infeccioso do vírus, os vectores adenovirais são incapazes de replicar em células normais, ou seja, só expressam o gene terapêutico. Desta forma, para a sua produção os genes virais em falta são fornecidos *trans* através do desenvolvimento de linhas celulares que os expressem constitutivamente, tais como HEK293 e PER.C6® para adenovírus humanos (revisto em [7]) e DK ou MDCK para CAV-2 [8]. A necessidade de quantidades consideráveis de vectores com grau de pureza clínico implicam o estabelecimento de processos de produção em larga escala, compatíveis com as boas práticas de fabrico. Enquanto que para os vectores adenovirais de 1ª geração já existem desenvolvimentos significativos permitindo a implementação de uma produção escalável [9-11], para vectores de 3ª geração são ainda poucos os desenvolvimentos nesse sentido, provavelmente devido à complexidade do sistema, uma vez que estes vectores não possuem nenhum gene viral e a sua manufacturação requer o fornecimento de todos os produtos virais, através de modificações adicionais na linha celular produtora e nos sistemas de produção e purificação [12]. A falta de um processo de produção compatível com aumento de escala tem travado a disponibilidade destes vectores para ensaios pré-clínicos. Nesse sentido, e face ao potencial dos vectores de CAV-2, foi desenvolvida uma linha celular para vectores CAV-2 de 3ª geração com produtividades de 300-500 partículas infecciosas (IP)/célula e 10⁸ IP/mL [8], assim como está a ser implementado um bioprocessamento escalável com estes vectores baseado em MDCK cultivadas com microcarriers [11].

Vectores Retrovirais e Lentivirais

Os vectores retrovirais foram os primeiros a ser utilizados em ensaios clínicos de terapia génica em 1990 e ainda se encontram entre os vectores virais mais utilizados. Mais recentemente, o interesse em vectores lentivirais, derivados de retrovírus complexos como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), têm vindo a aumentar devido à capacidade destes vectores transduzirem células quiescentes (em não divisão celular). Os vectores retrovirais e lentivirais apresentam características atractivas para a sua aplicação como veículos de transferência génica, tais como uma imunogenicidade reduzida, elevada eficiência de transdução tanto *in vivo* como *ex vivo*, capacidade para empacotar material genético até 9 kb e a capacidade para modificar permanentemente o conteúdo genético das células alvo, mantendo uma expressão duradoura do gene transferido [13, 14]. De acordo com estudos recentes, os vectores retrovirais e lentivirais representam 23% de todos os tipos de vectores utilizados e 33% dos vectores virais utilizados em ensaios clínicos de terapia génica (Figura 1B).

O desenvolvimento de células produtoras de vectores retrovirais ou lentivirais baseia-se na separação física do genoma viral em diferentes unidades transcricionais, de modo a minimizar o risco de formação de partículas virais com capacidade de replicação. Tal como para os vectores adenovirais, várias gerações de células produtoras de retrovírus ou lentiví-

rus têm sido desenvolvidas, visando sempre a eliminação ou redução do risco de formação de partículas replicativas. No caso dos vectores baseados em retrovírus simples como o vírus da leucemia murina (MLV), a baixa toxicidade dos genes virais permitiu o estabelecimento de várias linhas celulares que constitutivamente produzem vectores retrovirais [14]. O avanço da engenharia genética, em particular no desenvolvimento de sistemas de recombinação dirigida, permitiu também o estabelecimento de linhas celulares produtoras de vectores retrovirais muito flexíveis, em que o gene a ser transferido pode ser alterado sem interferir com a produtividade da linha celular [15]. A produção de vectores lentivirais é geralmente baseada em processos transientes ou indutíveis, uma vez que a elevada citotoxicidade de alguns componentes virais dificulta o desenvolvimento de linhas celulares para produção constitutiva destes vectores [16, 17].

Dada a elevada quantidade de partículas retrovirais necessárias por paciente num ensaio clínico, em conjunto com uma produtividade relativamente baixa e um tempo de meia vida reduzido dos vectores retrovirais e lentivirais, é fundamental otimizar os processos produtivos visando o aumento da produtividade, da qualidade dos vectores produzidos e redução dos custos de fabrico. Na Unidade de Tecnologia de Células Animais do iBET/ITQB-UNL vários aspectos com impacto na produtividade, qualidade, eficiência e segurança dos vectores retrovirais têm vindo a ser investigados, incluindo o efeito da pressão osmótica [18], da fonte de açúcar [19], da estequiometria dos vários componentes virais [20], efeito da redução de soro fetal no meio de cultura [21] e estratégias de purificação eficientes [22]. Nomeadamente, foi verificado um aumento da estabilidade dos vectores retrovirais quando produzidos a uma osmolaridade da cultura entre 450 e 500 mOsm/kg e também com a remoção de soro animal e adição de 0.1% (v/v) de colesterol ao meio de cultura. Estes e outros estudos têm fornecido bases importantes para o estabelecimento de processos eficientes de produção de vectores retrovirais e lentivirais que respeitem as directivas das boas práticas de fabrico, impulsionando a aplicação destes vectores virais em terapia génica.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Comissão Europeia (CLINIGENE -LSHB-CT2006-018933 e BrainCAV 222992) e da Fundação para a Ciência e Tecnologia (PTDC/EBB-BIO/100491/2008, PTDC/EBB-BIO/118621/2010 e PTDC/EBB-BIO/118615/2010). Paulo Fernandes e Rute Castro agradecem à FCT a atribuição das bolsas SFRH/BD/70810/2010 e SFRH/BPD/72523/2010, respectivamente.

Referências

- [1] Fischer, A., S. Hacein-Bey-Abina, and M. Cavazzana-Calvo. 2010. 20 years of gene therapy for SCID. *Nature immunology* 11:457-460.
- [2] Brentjens, R. J., M. L. Davila, I. Riviere, J. Park, X. Wang, L. G. Cowell, S. Bartido, J. Stefanski, C. Taylor, M. Olszewska, O. Borquez-Ojeda, J. Qu, T. Wasielewska, Q. He, Y. Bernal, I. V. Rijo, C. Hedvat, R. Kobos, K. Curran, P. Steinherz, J. Jurcic, T. Rosenblatt, P. Maslak, M. Frattini, and M. Sadelain. 2013. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science translational medicine* 5:177ra138.
- [3] LeWitt, P. A., A. R. Rezai, M. A. Leehey, S. G. Ojemann, A. W. Flaherty, E. N. Eskandar, S. K. Kostyk, K. Thomas, A. Sarkar, M. S. Siddiqui, S. B. Tatter, J. M. Schwalb, K. L. Poston, J. M. Henderson, R. M. Kurlan, I. H. Richard, L. Van Meter, C. V. Sapan, M. J. Doring, M. G. Kaplitt, and A. Feigin. 2011. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet neurology* 10:309-319.
- [4] Mountain, A. 2000. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol* 18:119-128.
- [5] Dormond, E., M. Perrier, and A. Kamen. 2009. From the first to the third generation adenoviral vector: what parameters are governing the production yield? *Biotechnol Adv* 27:133-144.
- [6] Bru, T., S. Salinas, and E. J. Kremer. 2010. An update on canine adenovirus type 2 and its vectors. *Viruses* 2:2134-2153.
- [7] Kovacs, L., and S. J. Hedley. 2010. Adenoviral producer cells. *Viruses* 2:1681-1703.
- [8] Fernandes, P., V. M. Santiago, A. F. Rodrigues, H. Tomas, E. J. Kremer, P. M. Alves, and A. S. Coroadinha. 2013. Impact of E1 and Cre on adenovirus vector amplification: developing MDCK CAV-2-E1 and E1-Cre trans-complementing cell lines. *PLoS One* 8:e60342.
- [9] Ferreira, T. B., A. L. Ferreira, M. J. Carrondo, and P. M. Alves. 2005. Effect of re-feed strategies and non-ammonogenic medium on adenovirus production at high cell densities. *J Biotechnol* 119:272-280.
- [10] Altaras, N. E., J. G. Aunins, R. K. Evans, A. Kamen, J. O. Konz, and J. J. Wolf. 2005. Production and formulation of adenovirus vectors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 99:193-260.
- [11] Fernandes, P., C. Peixoto, V. M. Santiago, E. J. Kremer, A. S. Coroadinha, and P. M. Alves. 2013. Bioprocess development for canine adenovirus type 2 vectors. *Gene Ther* 20:353-360.
- [12] Dormond, E., and A. A. Kamen. 2011. Manufacturing of adenovirus vectors: production and purification of helper dependent adenovirus. *Methods Mol Biol* 737:139-156.
- [13] Schweizer, M., and O. W. Merten. 2010. Large-scale production means for the manufacturing of lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* 10:474-486.
- [14] Coroadinha, A. S., L. Gama-Norton, A. I. Amaral, H. Hauser, P. M. Alves, and P. E. Cruz. 2010. Production of retroviral vectors: review. *Curr Gene Ther* 10:456-473.
- [15] Coroadinha, A. S., R. Schucht, L. Gama-Norton, D. Wirth, H. Hauser, and M. J. Carrondo. 2006. The use of recombinase mediated cassette exchange in retroviral vector producer cell lines: predictability and efficiency by transgene exchange. *J Biotechnol* 124:457-468.
- [16] Tomás, H. A., A. F. Rodrigues, P. M. Alves, and A. S. Coroadinha. 2013. Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges and Future Directions. In: *Gene Therapy - Tools and Potential Applications*, Dr. Francisco Martin (Ed.), ISBN: 978-953-51-1014-9, InTech, DOI: 10.5772/52534.
- [17] Rodrigues, A. F., P. M. Alves, and A. S. Coroadinha. 2011. Production of Retroviral and Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges in the Manufacturing of Lipid Enveloped Virus. In: *Viral Gene Therapy*, Dr. Ke Xu (Ed.), ISBN: 978-953-307-539-6, InTech, DOI: 10.5772/18615.
- [18] Coroadinha, A. S., A. C. Silva, E. Pires, A. Coelho, P. M. Alves, and M. J. Carrondo. 2006. Effect of osmotic pressure on the production of retroviral vectors: Enhancement in vector stability. *Biotechnol Bioeng* 94:322-329.
- [19] Coroadinha, A. S., J. Ribeiro, A. Roldao, P. E. Cruz, P. M. Alves, O. W. Merten, and M. J. Carrondo. 2006. Effect of medium sugar source on the production of retroviral vectors for gene therapy. *Biotechnol Bioeng* 94:24-36.
- [20] Carrondo, M. J., O. W. Merten, M. Haury, P. M. Alves, and A. S. Coroadinha. 2008. Impact of retroviral vector components stoichiometry on packaging cell lines: effects on productivity and vector quality. *Hum Gene Ther* 19:199-210.
- [21] Rodrigues, A. F., M. Carmo, P. M. Alves, and A. S. Coroadinha. 2009. Retroviral vector production under serum deprivation: The role of lipids. *Biotechnol Bioeng* 104:1171-1181.
- [22] Bandeira, V. S., C. Peixoto, A. F. Rodrigues, P. Cruz, P. Alves, A. S. Coroadinha, and M. Carrondo. 2012. Downstream Processing of Lentiviral Vectors: releasing bottlenecks. *Hum Gene Ther Methods* 23:255-63.

A importância da purificação de plasmídeos para terapia génica

Fani Sousa

CICS-UBI: Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

E-mail: fani.sousa@fcsaude.ubi.pt

Resumo

A eficácia da terapia génica depende fortemente do desenvolvimento de plataformas adequadas para a produção e purificação de plasmídeos, em quantidade e com pureza adequadas à aplicação terapêutica. O cumprimento dos critérios estabelecidos pelas agências reguladoras requer a optimização das tecnologias de purificação. Recentemente tem vindo a ser desenvolvida uma metodologia de afinidade, com utilização de aminoácidos como ligandos, que permite a obtenção da conformação biologicamente activa dos plasmídeos. Com este procedimento, é aqui descrita a título de exemplo, a preparação de uma formulação contendo plasmídeo superenrolado, com potencialidade para restabelecer a expressão da proteína p53, em células cancerígenas.

Introdução

O progresso na investigação de novas abordagens terapêuticas, como a terapia génica, apenas foi possível com o desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante e a descoberta do genoma humano. Com a inserção de material genético específico em determinadas células do organismo é induzida a expressão das proteínas codificadas pelos respectivos genes, resultando no controlo e/ou reversão da condição patológica.

O conceito de terapia génica surge como alternativa clínica para o tratamento de diversas patologias, como o cancro, cuja prevalência tem vindo a aumentar. De facto, segundo dados de 2013, cerca de 64% dos ensaios clínicos a decorrer têm como alvo terapêutico o cancro (<http://www.abedia.com/wiley/indications.php>). Em 2003 foi aprovado na China o primeiro produto terapêutico para terapia génica de um carcinoma. Neste caso particular, foi usado um vector viral que transporta e insere o gene supressor de tumores, p53, nas células tumorais, induzindo a morte celular [1]. Apesar dos vectores virais estarem normalmente associados a elevadas eficiências de transferência de material genético, a imunogenicidade intrínseca à utilização de um vírus restringe a sua aplicação prolongada. Por esta razão a aplicação de vectores não-virais, como os plasmídeos, para a distribuição de genes de interesse às células tem vindo a ser cada vez maior. Neste sentido, torna-se crucial o desenvolvimento de novas plataformas biotecnológicas para a produção e purificação de plasmídeos que respondam não só à necessidade de obtenção de elevadas quantidades mas também de plasmídeo de elevada qualidade [2].

Neste trabalho é apresentada uma abordagem de purificação de DNA plasmídico, desenvolvida recentemente, que se baseia na utilização de aminoácidos como ligandos de afi-

nidade, de forma a estabelecer interações específicas com o plasmídeo a purificar. O projecto foi desenvolvido com o objectivo de purificar um plasmídeo (pcDNA flag p53; Addgene; Cambridge, MA, USA) que codifica a proteína p53, para posterior aplicação na terapia do cancro.

Purificação de Plasmídeos

A formulação de um plasmídeo para aplicação terapêutica requer a implementação de estratégias de purificação altamente eficientes. No âmbito da etapa de purificação de bioprodutos, a cromatografia tem sido amplamente utilizada e alvo de optimização. De facto, nesta etapa do processo é crucial que o plasmídeo conserve a sua qualidade e actividade biológica, tendo em conta os critérios de qualidade estabelecidos pelas agências reguladoras. Para garantir a transferência eficiente do DNA plasmídico para as células e o sucesso da expressão da proteína codificada é essencial que o plasmídeo produzido se apresente maioritariamente (>97%) na conformação superenrolada e esteja livre de contaminantes. O processo de produção recombinante num hospedeiro bacteriano conduz à recuperação do plasmídeo num extracto complexo contendo diversas impurezas, nomeadamente DNA genómico, RNA, proteínas e endotoxinas associadas ao sistema hospedeiro e ainda outras conformações do DNA plasmídico, que por não apresentarem o mesmo nível de eficiência e actividade biológica, são consideradas contaminantes.

A cromatografia, sendo uma técnica amplamente usada na biotecnologia, desempenha um papel central na purificação de plasmídeos. Para a separação de DNA têm sido utilizados diferentes tipos de cromatografia, como a filtração em gel, a troca iónica, a fase reversa, a afinidade e a interacção hidrofóbica [3], sendo que nem todos conduzem a uma separação eficiente das isoformas do plasmídeo.

A cromatografia de afinidade é a técnica associada à maior selectividade e especificidade na separação de uma molécula alvo, sendo que a interacção com o ligando ocorre mediante a sua função biológica ou estrutura [4]. Nos últimos anos, e tendo por base as interacções que ocorrem entre proteínas e ácidos nucleicos a nível celular, tem vindo a ser desenvolvida uma nova metodologia para a purificação de plasmídeos, usando aminoácidos como ligandos específicos.

Cromatografia de afinidade com aminoácidos

Como referido, de entre as diversas técnicas cromatográficas, a afinidade tem sido explorada em diferentes vertentes para a purificação de ácidos nucleicos [5]. No entanto, considerando as particularidades e requisitos associados à purificação de plasmídeos para aplicação terapêutica, novas metodologias são alvo de estudo na tentativa de melhorar a eficiência desta etapa. A recente abordagem de utilização de aminoácidos como ligandos específicos foi planeada no sentido de alcançar o maior grau de pureza para amostras de plasmídeos, considerando os critérios estabelecidos pela FDA, quer em termos de eliminação de contaminantes quer em termos de isolamento da conformação biologicamente activa. Com este projecto tem sido possível a implementação de diferentes estratégias de purificação de plasmídeos na conformação superenrolada, utilizando a histidina [6,7], a lisina [8], a arginina [9,10] ou derivados [11], como ligandos de afinidade. Na tabela 1 são apresentados os principais resultados desta metodologia, considerando a purificação de um plasmídeo modelo (pVAX1-LacZ) na conformação superenrolada, a partir de lisados de *E. coli*.

No caso da histidina, a aplicação de um gradiente decrescente de sulfato de amónio permitiu isolar selectivamente o plasmídeo superenrolado de todos os contaminantes presentes no lisado. Os resultados mostraram que a matriz com histidina imobilizada não promove qualquer interacção específica com o plasmídeo na conformação circular aberta ou com o DNA genómico, enquanto que o plasmídeo superenrolado é especificamente reconhecido. Os resultados obtidos sugerem que a histidina interage preferencialmente com as bases nucleotídicas do plasmídeo, através de pontes de hidrogénio ou por interacções hidrofóbicas entre os anéis ("ring stacking") [6,7]. Assim, é proposto que a interacção

que ocorre entre as bases do plasmídeo superenrolado e a histidina é essencialmente devida à maior exposição das bases, presente nesta conformação. A eficiência desta matriz foi avaliada através do controlo rigoroso da qualidade do plasmídeo superenrolado purificado com esta estratégia de afinidade. A análise dos diversos parâmetros recomendados pelas agências reguladoras revelou que o plasmídeo purificado com a matriz histidina-agarose cumpre todos os critérios de qualidade no que diz respeito à eliminação total de RNA e proteínas e ao conteúdo residual de gDNA e endotoxinas, que está dentro dos valores permitidos e regulamentados [6]. A avaliação da actividade biológica do plasmídeo purificado foi realizada através de estudos de transfecção, que revelaram uma eficiência de 50% na expressão da proteína codificada no plasmídeo.

Relativamente à aplicação dos aminoácidos de lisina e arginina como ligandos, foi verificado que devido à diferente tipologia de interacções, era possível aplicar um gradiente de NaCl para purificar o plasmídeo. De facto, estas condições revelaram ser mais adequadas à posterior aplicação do plasmídeo a nível celular. Neste caso, considerando o carácter positivo dos aminoácidos, as principais interacções estabelecidas são electrostáticas, apesar de outras interacções fracas (nomeadamente pontes de hidrogénio) desempenharem um papel fundamental no reconhecimento bioespecífico da conformação superenrolada [8-10]. A caracterização da eficiência destes métodos na purificação do plasmídeo modelo revelou ser possível a obtenção da isoforma superenrolada com um grau de pureza adequado à aplicação. A metodologia com lisina [8] conduziu a resultados semelhantes aos descritos para a histidina (tabela 1), no entanto a aplicação da matriz de arginina revelou-se mais vantajosa. As principais vantagens deste processo estão relacionadas com o rendimento de 79% de recuperação do plasmídeo superenrolado e também pelo aumento da eficiência de transfecção para 62%. O facto desta técnica, com arginina imobilizada, permitir a utilização de condições cromatográficas de ligação e eluição do plasmídeo menos drásticas, parece favorecer a manutenção da estrutura do plasmídeo, que se relaciona directamente com a melhoria significativa da sua actividade biológica [9,10].

No âmbito da aplicação do plasmídeo pcDNA flag p53 para potencial aplicação na terapia do cancro foi seleccionada a

Tabela 1 – Caracterização da purificação de plasmídeos nas matrizes de afinidade com aminoácidos imobilizados.

	Gradiente	Retenção relativa na coluna				Principais Interacções	Caracterização do sc pDNA purificado			Referências
		oc pDNA	gDNA	sc pDNA	RNA		Recuperação	Pureza	Eficiência Transfecção	
Histidina	[(NH ₄) ₂ SO ₄] Decrescente	-	-	+	++	Hidrofóbicas; Pontes de Hidrogénio; van der Waals	45%	> 97%	50%	[6,7]
Lisina	[NaCl] Crescente	-	-	+	++	Electrostáticas; Pontes de Hidrogénio	45%	> 97%	44%	[8]
Arginina	[NaCl] ou [Arginina] Crescente	-	-	++	+	Electrostáticas; Pontes de Hidrogénio	79%	> 97%	62%	[9,10]

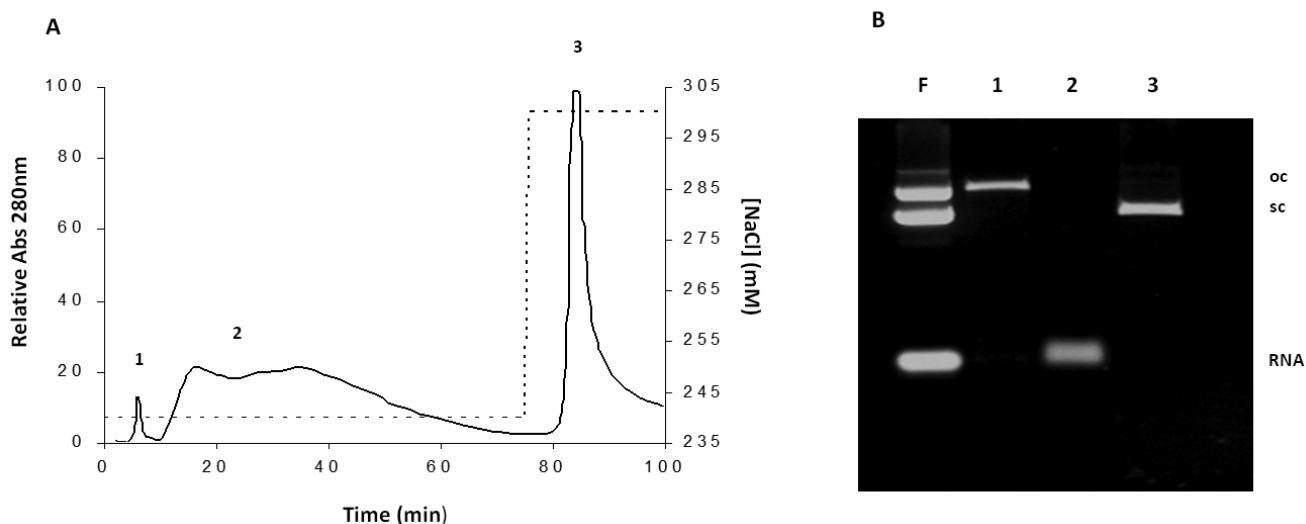


Figura 1 – A) Perfil cromatográfico representativo da purificação do plasmídeo superenrolado a partir de lisado de *E. coli* usando a matriz arginina-agarose. A linha tracejada representa o gradiente crescente de NaCl, com dois passos consecutivos de 240 e 300 mM. B) Electroforese em gel de agarose das amostras recolhidas da coluna. As fracções correspondentes aos picos 1, 2 e 3 estão respectivamente apresentadas nas linhas 1, 2 e 3. A- indica a amostra inicial, injectada na coluna cromatográfica. (adaptado de [9])

matriz de arginina para a purificação da isoforma superenrolada. A figura 1 apresenta o perfil cromatográfico (figura 1A) e a electroforese em gel de agarose (figura 1B) que comprova a purificação do plasmídeo alvo. O plasmídeo superenrolado, recuperado no pico 2 foi posteriormente encapsulado em nanopartículas [12] com o objectivo de manter a sua estabilidade e facilitar a entrega às células.

Após a preparação do plasmídeo puro, a transfecção foi realizada usando a linha celular A549, que consiste numa linha de carcinoma de pulmão, e a internalização do plasmídeo encapsulado foi acompanhada por microscopia confocal. O sucesso da terapia génica depende da manutenção da estabilidade e actividade do plasmídeo e também da sua entrada eficiente nas células. A figura 2A apresenta o plasmídeo encapsulado marcado a verde, o citoplasma da célula em vermelho e o núcleo marcado de azul, sendo comprovada a entrada do plasmídeo nas células eucarióticas. Para além disso, é igualmente visível a diferença de distribuição do plasmídeo nas conformações circular aberta e superenrolada, após 6 horas de transfecção. De facto, o plasmídeo superenrolado, por ser mais compacto, entra na célula mais facilmente e é mais eficiente na internalização nuclear.

Com a confirmação da entrada do plasmídeo na célula tornou-se crucial caracterizar a expressão da proteína p53, codificada pelo gene clonado no plasmídeo. As figuras 2B e 2C representam a análise do resultado da expressão da proteína p53 obtido por Western blot. A figura 2C apresenta a densidade relativa das bandas resultantes de 2B, revelando uma maior expressão associada à aplicação do plasmídeo superenrolado nas células. Dado que a expressão da proteína p53 pode conduzir à morte celular programada, este parâmetro foi também avaliado para evidenciar o resultado da aplicação do plasmídeo que codifica para esta proteína. A figura 2D revela o resultado da citometria de fluxo que permite avaliar a apoptose. Este resultado mostrou um maior nível de apoptose nas células transfectadas com o plasmídeo su-

perenrolado, purificado com a matriz de arginina. Assim, foi possível confirmar que a conformação do plasmídeo é extremamente relevante na determinação da eficácia terapêutica, uma vez que é a conformação superenrolada do plasmídeo que apresenta maior actividade biológica [13].

Conclusões

Globalmente, foi apresentado um exemplo da aplicação de uma metodologia eficiente para a purificação selectiva de plasmídeos, usando cromatografia de afinidade com aminoácidos imobilizados, que permite não só a eliminação de contaminantes associados ao processo de produção recombinante, mas também o isolamento da isoforma biologicamente activa do plasmídeo. O controlo rigoroso de todas as condições utilizadas no processo de purificação é de extrema relevância para a manutenção da estabilidade do plasmídeo, essencial à sua aplicação terapêutica. Os ensaios revelaram ser possível o restabelecimento da expressão da proteína p53 em células cancerígenas, sendo esta expressão mais significativa quando é aplicada uma formulação com plasmídeo superenrolado. Assim, a tecnologia apresentada mostra potencial para o desenvolvimento de uma plataforma que integra a produção e purificação de plasmídeos com qualidade adequada à aplicação em terapia génica.

Agradecimentos

Agradeço ao CICS-UBI e especialmente a toda a equipa (investigadores e bolseiros) que contribuíram para os estudos mencionados. Estes trabalhos foram suportados financeiramente pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através dos projectos PTDC/EBB-BIO/114320/2009 e PEst-C/SAU/UI0709/2011 COMPETE.

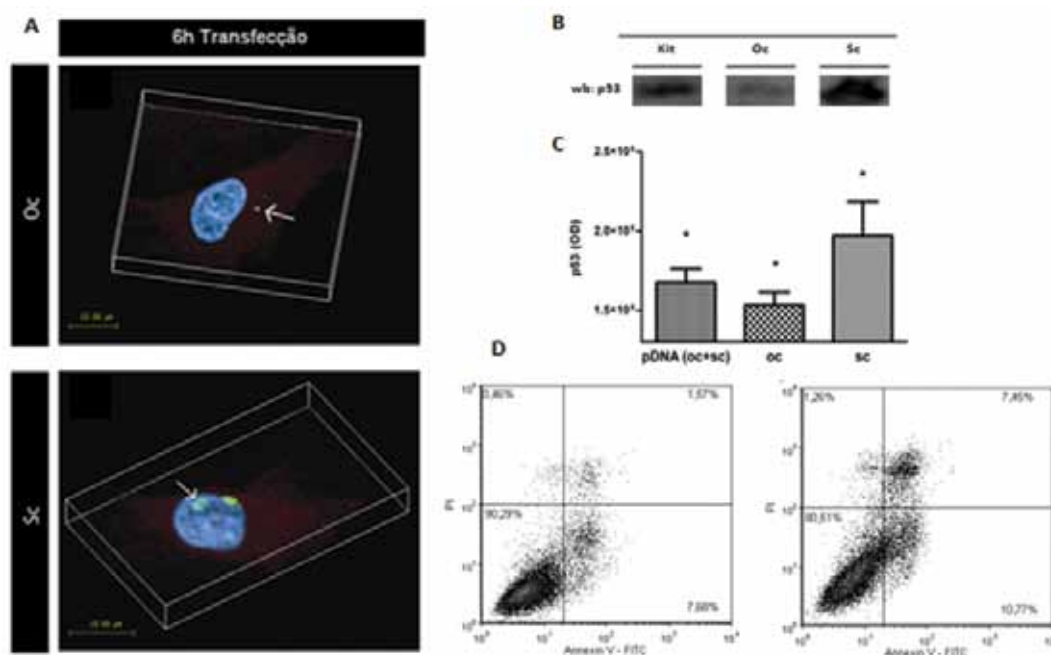


Figura 2 – Caracterização da transfecção de células com o plasmídeo purificado com a matriz de arginina-agarose e expressão da proteína p53. A) Imunofluorescência das células A549 transfectadas com o plasmídeo encapsulado nas conformações superenrolada e circular aberta. O núcleo foi corado de azul (Hoesht® 33342), o plasmídeo está marcado de verde (FITC) e a célula de vermelho (Anti-VE cadherin - Alexa 546 antibody). B) Análise da expressão da proteína p53 por Western blot. C) Representação do resultado da expressão da proteína p53 através da avaliação da densidade de bandas. D) Avaliação por citometria de fluxo da apoptose mediada pela expressão da proteína p53 nas células HeLa, após aplicação do plasmídeo circular aberto (esquerda) e superenrolado (direita). (adaptado de [13])

Referências

- [1] Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. 2005. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J* 7(1):E61-77.
- [2] Liu MA. 2003. DNA vaccines: a review. *J Intern Med* 253(4):402-10.
- [3] Diogo MM, Queiroz JA, Prazeres DMF. 2005. Chromatography of plasmid DNA. *J Chromatogr A* 1069(1):3-22.
- [4] Lowe CR, Lowe AR, Gupta G. 2001. New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. *J Biochem Biophys Methods* 49(1-3):561-74.
- [5] Sousa F, Prazeres DMF, Queiroz JA. 2008. Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends Biotechnol* 26: 518-25.
- [6] Sousa F, Freitas S, Azzoni AR, Prazeres DMF, Queiroz JA. 2006. Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step. *Biotechnol Appl Biochem* 45: 131-40.
- [7] Sousa F, Prazeres DMF, Queiroz JA. 2007. Circular dichroism investigation of the effect of plasmid DNA structure on retention in histidine chromatography. *Arch Biochem Biophys*. 467: 154-62.
- [8] Sousa A, Sousa F, Queiroz JA. 2011. Impact of lysine-affinity chromatography on supercoiled plasmid DNA purification. *J Chromatogr B* 879: 3507-15.
- [9] Sousa F, Prazeres DMF, Queiroz JA. 2009. Improvement of transfection efficiency by using supercoiled plasmid DNA purified with arginine affinity chromatography. *J Gene Med* 11: 79-88.
- [10] Sousa F, Matos T, Prazeres DMF, Queiroz JA. 2008. Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography. *Anal Biochem*. 374: 432-34.
- [11] Gaspar VM, Cruz C, Queiroz JA, Pichon C, Correia IJ, Sousa F. 2013. Sensitive detection of peptide - minicircle DNA interactions by Surface Plasmon Resonance. *Anal Chem*. 85: 2304-11.
- [12] Gaspar V, Sousa F, Queiroz JA, Correia I. 2011. Formulation of chitosan-TPP-pDNA nanocapsules for gene therapy applications. *Nanotechnology* 22: 015101.
- [13] Gaspar VM, Correia IJ, Sousa Â, Silva F, Paquete CM, Queiroz JA, Sousa F. 2011. Nanoparticle Mediated Delivery of Pure P53 Supercoiled Plasmid DNA For Gene Therapy. *J Control Release* 156: 212-22.

spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

Visite o nosso site
www.spbt.pt

Design, construção e produção de minicírculos como vectores de entrega de genes

Michaela Simcikova¹, Duarte M. F. Prazeres^{1,2}, Gabriel A. Monteiro^{1,2}

¹IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Center for Biological and Chemical Engineering, Lisboa

²Departamento de Bioengenharia, Instituto Superior Técnico, Lisboa

Av. Rovisco Pais, 1049-001, Lisboa, Portugal - Tel.: + 351 218 419 133

E-mail: gabmonteiro@ist.utl.pt

O uso de plasmídeos convencionais como vectores para transportar e entregar genes específicos até células alvo, com aplicações em terapia génica e vacinação com DNA, ganhou um interesse considerável durante as últimas duas décadas. Até o momento, foram iniciados e/ou realizados cerca de 470 ensaios clínicos de terapia genética usando plasmídeos (www.wiley.co.uk/genmed/clinical). No entanto, os resultados de ensaios clínicos com vectores plasmídicos em vacinação com DNA e tratamentos de terapia génica têm sido algo decepcionantes em termos de eficácia. Vários motivos podem explicar esta falta de desempenho: *I*) o tamanho dos plasmídeos que dificulta a sua entrada na célula e núcleo, *II*) a existência de nucleases que degradam os plasmídeos durante o tráfego extra- e intracelular e *III*) o silenciamento da expressão dos transgenes [1]. Como resultado, o nível de expressão do transgene transportado pelo plasmídeo é usualmente baixo e de curta duração. Os vectores virais constituem uma alternativa ao uso de plasmídeos pois são mais eficazes, mas apresentam alguns problemas de segurança. Pelo contrário, os plasmídeos têm um histórico muito bom em termos de segurança clínica, embora existam algumas preocupações relativas à indução de reacções imunogénicas indesejáveis e um potencial teórico de integração no DNA genómico do hospedeiro.

Alguns destes eventos prejudiciais podem ser atribuídos à presença de sequências de DNA de origem bacteriana presentes no vector plasmídico, tais como marcas de resistência a antibióticos, promotores ou motivos CpG não metilados. Por exemplo, algumas sequências de DNA bacterianas presentes no plasmídeo são responsáveis pelo silenciamento do transgene [2]. Os motivos CpG bacterianos são também capazes de iniciar respostas inflamatórias. Se devidamente controlado, este efeito até poderá ser vantajoso no caso de vacinas de DNA, mas não é de todo desejável num contexto de terapia génica. Assim, a remoção dos motivos CpG de um vector plasmídico pode melhorar substancialmente a segurança e a duração da expressão da função terapêutica codificada [3]. Marcas selectivas de antibióticos são normalmente usadas em plasmídeos pois são uma maneira conveniente para a sua selecção durante a produção. O uso destas marcas é desaconselhado por agências reguladoras como a EMA e FDA já que pode aumentar o risco de disseminação de resis-

tências a antibióticos para microrganismos ambientais e também provocar reacções alérgicas devido à presença de resíduos de antibióticos nas preparações de plasmídeos. Embora essenciais para a selecção e replicação durante a fase de produção em *Escherichia coli*, a maior parte das sequências descritas acima (motivos CpG, marcas selectivas, promotores procariotas) não são necessárias para a expressão de genes eucarióticos e, pelo contrário, podem dar origem a alterações na regulação transcricional e/ou pós-transcricional dos genes de interesse. A tendência actual a seguir no desenvolvimento de vectores de DNA passa pela exclusão de sequências que são inúteis do ponto de vista da aplicação final e utilização exclusiva de cassetes de expressão eucariótica. Os minicírculos constituem um exemplo destes novos vectores.

Os minicírculos são moléculas de DNA em dupla cadeia, covalentemente fechadas, superenroladas e desprovidas de sequências bacterianas, que apresentam normalmente eficiências superiores de transfecção e expressão de vários transgenes quando comparados com os seus plasmídeos parentais (revisto em [4]). O sistema típico para a produção de minicírculos inclui uma recombinação *in vivo* entre duas repetições directas presentes no DNA plasmídico parental (Figura 1). Este evento origina dois tipos de moléculas superenroladas: uma molécula de minicírculo (MC), que transporta a cassette de expressão eucariótica, e uma molécula indesejada de miniplasmídeo (MP) que possui os elementos bacterianos necessários à replicação do plasmídeo parental. Um processo de produção de minicírculos contempla assim uma fase inicial de replicação de um plasmídeo parental, seguida de uma etapa em que se promove a recombinação e consequente acumulação do MC alvo e do MP.

As primeiras tentativas para produzir minicírculos foram baseadas numa única cópia do gene numa recombinase inserida no cromossoma do hospedeiro, resultando numa eficiência de recombinação relativamente baixa (<60%) [5]. Vários trabalhos mostraram que a recombinação completa pode ser conseguida se cada plasmídeo parental possuir uma cópia de recombinase [6]. A recombinação completa do plasmídeo parental a partir do cromossoma é também possível, se a expressão for conduzida por mais do que uma cópia do gene, tal como demonstrado pelo uso de dez cópias da integrase ϕ C31 em *E. coli* [7].

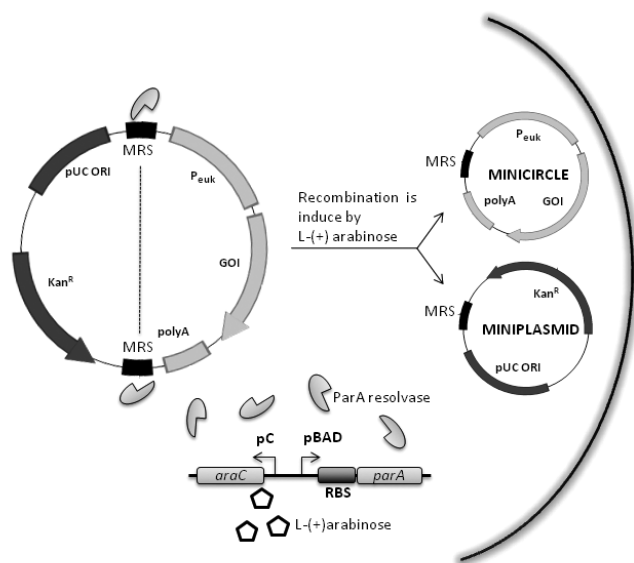


Figura 1 – O minicírculo é gerado *in vivo* em estirpes hospedeiras de *E. coli* a partir dum plasmídeo parental devido à actividade de resolvase ParA que catalisa a recombinação intramolecular entre os locais MRS, originando duas moléculas de DNA circular, uma contendo a cassette de expressão eucariótica (minicírculo) e a outra as sequências bacterianas (miniplasmídeo). O gene da ParA resolvase sob controlo apertado de transcrição pelo promotor pBAD/araC pode ser inserido no plasmídeo parental ou num plasmídeo ajudante ou no cromossoma da bactéria. (MRS: local de resolução múltiplos do sistema da resolvase ParA; P_{euk}: promotor eucariótico; GOI: gene codificante da proteína de interesse; polyA: sinal de poliadenilação; Kan^R: gene de resistência à canamicina; pUC ORI: origem de replicação bacteriana; AraC: gene que codifica para o repressor do operão arabinose; pBAD: promotor do operão BAD; parA: gene da resolvase ParA.

O uso de minicírculos em ensaios de terapia génica e vacinação com DNA é neste momento limitado pela falta de tecnologias capazes de produzir quantidades de minicírculos à escala de gramas-kilogramas necessárias para efectuar ensaios pré-clínicos e clínicos. Actualmente a produção de plasmídeos pode atingir produtividades volumétricas da ordem dos 2,6 g/L [8], o que contrasta fortemente com os valores obtidos na produção de minicírculos, que não ultrapassam os 5 mg/L [5–7]. Estas baixas produtividades podem ser atribuídas a um pequeno número de recombinases e/ou a uma actividade reduzida das recombinases expressas nas células de *E. coli* na fase de máxima produção de plasmídeo parental. Além disso, a separação de moléculas com características físico-químicas muito semelhantes, como é o caso de minicírculos, de miniplasmídeos e plasmídeos parentais não recombinados, é muito problemática sendo os métodos actualmente disponíveis baseados em estratégias complexas que incluem processos de afinidade [6] ou reagentes tóxicos [5]. Claramente, é necessário desenvolver novos métodos de produção e purificação para que a utilização clínica de minicírculos se possa tornar uma realidade.

No nosso laboratório estamos a desenvolver um sistema robusto e escalável para a produção de grandes quantidades de MCs. O plasmídeo parental modelo foi construído de modo a gerar MCs capazes de expressar a proteína repórter GFP, que permite avaliar a eficiência de transfecção em diferentes linhas de células animais. A recombinase escolhida foi a resolvase ParA que catalisa a recombinação *in vivo* entre dois locais de resolução de múltiplos (MRS). Esta recombinase está sob o controlo transcrricional do sistema pBAD/AraC de expressão induzível pela arabinose. Neste sistema de recombinação observa-se alguma recombinação indesejada do plasmídeo parental em MCs e MPs na fase inicial de replicação devido à expressão da ParA não induzida (*leaky*) pelo promotor pBAD. Como consequência, as moléculas de miniplasmídeo geradas, mais pequenas que o plasmídeo parental, e que contêm a origem de replicação acabam por dominar a população de plasmídeos ainda antes da fase de indução da recombinação que deverá ser feita apenas quan-

do a quantidade de plasmídeo parental atinge valores elevados na cultura. Embora a adição de glucose permita evitar essa expressão *leaky* da ParA, este açúcar, em condições de crescimento celular em que o pH não é controlado, leva a um abaixamento de pH e consequente inibição do crescimento celular e da produção de plasmídeo parental, e logo da produção de MCs [9].

Para além da escolha da recombinase a usar é fundamental definir que níveis da sua expressão são necessários e em que local (cromossoma ou plasmídeo) o gene da recombinase deverá estar localizado. Assim, três sistemas diferentes para a recombinação foram criados em que: I) o gene *parA* foi colocado no plasmídeo parental, II) a resolvase ParA foi expressa a partir de um plasmídeo ajudante que replica em baixo número de cópias e III) o gene *parA* foi inserido numa cópia única no cromossoma da estirpe hospedeira [9,10]. O aumento da expressão da resolvase ParA foi efectuado pela modificação da sequência de ligação ao ribossoma (Ribosome Binding Site) aumentando deste modo a eficiência de tradução do transcrito da resolvase ParA no hospedeiro [10]. A estirpe *E. coli* BW27783, que é capaz de absorver mais facilmente a arabinose presente no meio de cultura devido à expressão constitutiva dum transportador da arabinose (AraE), foi usada no nosso grupo como base para construção de estirpes produtoras de minicírculos pois é mais sensível ao indutor (arabinose). Esta estirpe foi modificada por eliminação dos genes críticos codificantes da endonuclease A (*endA*) e da recombinase A (*recA*), originando uma estirpe (*endA⁻ recA⁻*) capaz de produzir plasmídeos em elevada quantidade e qualidade e de absorver facilmente a arabinose indutora. Esta estirpe serviu de base aos três sistemas de produção da resolvase ParA em estudo (plasmídeo parental, plasmídeo ajudante, cromossoma), que promove a recombinação do plasmídeo parental em MCs e MPs. Os três sistemas de produção mostraram eficiências de recombinação relativamente próximas (Tabela 1) excepto quando a resolvase contendo a RBS original foi inserida numa cópia única no cromossoma. Um balanço entre o número de cópias do gene da resolvase e a força da RBS pode ser obtida (tabela 1) de modo a

Tabela 1 – Eficiência de recombinação em diferentes sistemas de expressão da ParA resolvase induzidos no início da fase estacionária. O plasmídeo ajudante é de baixo número de cópias.

Localização parA	RBS	Eficiência de recombinação (%)
Plasmídeo parental	original	88
Plasmídeo ajudante	original	88
	otimizada	91
Cromossoma	original	33
	otimizada	90

expressar as quantidades suficientes de resolvase para uma recombinação eficiente. Em condições otimizadas foi possível aumentar a produção de MCs em fermentador em 10 vezes relativamente ao descrito na literatura.

Agradecimentos

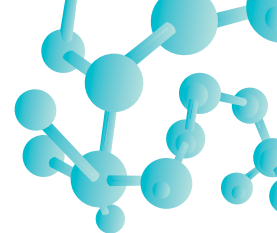
Este trabalho foi financiado pelo programa MIT-Portugal e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através da bolsa de doutoramento (SFRH/BD/33786/2009) a Michaela Šimčíková e do projecto PTDC/EBB-EBI/113650/2009.

Referências

- [1] Faurez F, Dory D, Le Moigne V, Gravier R, Jestin A. Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. *Vaccine* 2010;28:3888–95.
- [2] Chen ZY, Riu E, He CY, Xu H, Kay MA. Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Mol Ther* 2008;16:548–56.
- [3] Yew NS, Zhao H, Przybylska M, Wu I-H, Tousignant JD, Scheule RK, et al. CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo. *Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy* 2002;5:731–8.
- [4] Mayrhofer P, Schleef M, Jechlinger W. Use of minicircle plasmids for gene therapy. *Methods Mol Biol* 2009;542:87–104.
- [5] Bigger BW, Tolmachov O, Collombet JM, Fragkos M, Palaszewski I, Cou-telle C. An araC-controlled bacterial cre expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy. *J Biol Chem* 2001;276:23018–27.
- [6] Mayrhofer P, Blaesens M, Schleef M, Jechlinger W. Minicircle-DNA production by site specific recombination and protein-DNA interaction chromatography. *J Gene Med* 2008;10:1253–69.
- [7] Kay MA, He CY, Chen ZY. A robust system for production of minicircle DNA vectors. *Nat Biotechnol* 2010;28:1287–9.
- [8] Carnes AE, Luke JM, Vincent JM, Schukar A, Anderson S, Hodgson CP, et al. Plasmid DNA fermentation strain and process-specific effects on vector yield, quality, and transgene expression. *Biotechnology and Bio-engineering* 2011;108:354–63.
- [9] Simcikova M, Prather KLJ, Prazeres DMF, Monteiro GA. On the dual effect of glucose during production of pBAD/AraC based minicircles. *Vaccine*. *In press*.
- [10] Simcikova M, Prather KLJ, Prazeres DMF, Monteiro GA. Development of a minicircle production system based on ParA resolvase – mediated in vivo recombination n.d.: *Hum Gene Ther Met*. *Submitted*.

spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

Actualize as suas quotas em
www.spbt.pt



Bioengenharia de células estaminais pluripotentes humanas para aplicação clínica

Cláudia Correia, Nuno Espinha, Catarina Brito, Margarida Serra, Paula M. Alves

iBET – Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Oeiras, Portugal

ITQB-UNL – Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal

E-mail: marques@itqb.unl.pt, mserra@itqb.unl.pt

As células estaminais pluripotentes humanas (hPSCs), incluindo as células estaminais embrionárias (hESCs) e as células estaminais pluripotentes induzidas (hiPSCs), são conhecidas pelas capacidades de proliferar indefinidamente (auto-renovação) e de diferenciar em todas as células do organismo adulto (pluripotência). Estas propriedades conferem a estas células uma enorme aplicabilidade em medicina regenerativa, terapia celular, rastreio de novos fármacos e em investigação científica por constituírem modelos celulares únicos para o estudo e compreensão dos processos de desenvolvimento embrionário e dos mecanismos associados ao aparecimento e progressão de doenças [1].

Durante a última década as hPSCs têm sido indicadas como potenciais soluções para o tratamento de doenças originadas pela morte e/ou falta de regeneração de células que constituem alguns tecidos (tais como as doenças de Alzheimer e Parkinson [2], diabetes [3], enfarte do miocárdio [4] ou degeneração da retina [5]). No entanto, poucos ensaios clínicos utilizando hPSCs ou derivados de hPSCs decorreram até à data. Actualmente, apenas dois ensaios clínicos estão a ser realizados. Estes estão a ser conduzidos pela Advanced Cell Technology e utilizam células derivadas de hESCs para o tratamento de duas doenças oculares que afectam a área central da retina (mácula) e que conduzem à cegueira: a distrofia macular de Stargardt e a degeneração macular relacionada à idade (www.clinicaltrials.gov, NCT01345006 e NCT01344993).

Apesar dos inúmeros avanços científicos, a transição de hPSCs e derivados para a clínica está a ser lenta, em grande parte devido à falta de metodologias robustas, passíveis de aumento de escala e economicamente viáveis que assegurem a produção destas células em quantidade, pureza e qualidade adequada para a sua aplicação terapêutica. A complexidade inerente a este tipo de células tem dificultado o desenvolvimento destes processos, constituindo actualmente, e durante os próximos anos, um desafio aliciente na área.

Em geral, milhões (10^6) a bilhões (10^9) de células são necessárias para regenerar um tecido. Por exemplo, estima-se que para regenerar o tecido cardíaco após um enfarte de miocárdio sejam necessários $1\text{--}2 \times 10^9$ cardiomiócitos por paciente [6]. Por outro lado é de extrema importância o desenvolvimento de protocolos eficientes que permitam controlar o processo de diferenciação celular, de modo a obter uma cultura homogênea de células diferenciadas num único fe-

nótipo desejado. É de conhecimento geral que as hPSCs no seu estado indiferenciado apresentam um potencial tumorigénico quando injectadas num paciente [7]. Desta forma, é essencial desenvolver estratégias para eliminar eficientemente as células indiferenciadas ou diferenciadas noutras linhagens antes de proceder ao transplante das células de interesse. Análises de controlo de qualidade devem ser efectuadas com regularidade, de modo a monitorizar o fenótipo, genótipo e funcionalidade das células ao longo de todo

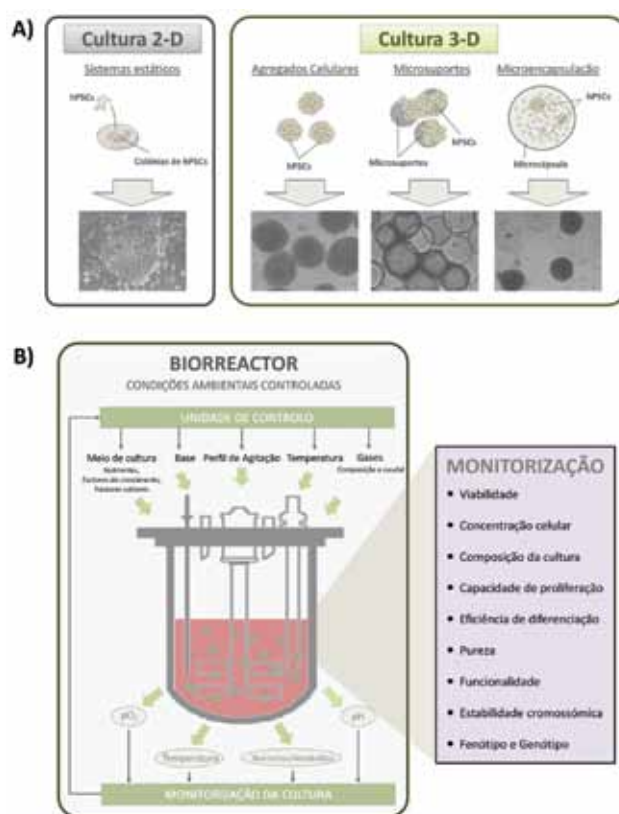


Figura 1 – Sistemas de cultura 2-D e 3-D de hPSCs. A) As hPSCs são rotineiramente cultivadas em monocamadas bi-dimensionais (2-D) em placas. De forma a melhorar a reprodutibilidade e eficiência das culturas, têm vindo a ser desenvolvidos novos sistemas de cultura que permitem às células adquirir uma conformação tridimensional (3-D) semelhante à encontrada *in vivo*: agregados celulares, células imobilizadas em microsuportes e microencapsulação de células em hidrogéis. B) Representação esquemática de um biorreator de tanque agitado para cultivo de hPSCs. Os biorreactores oferecem um controlo automatizado das condições ambientais (oxigénio dissolvido, temperatura, pH) permitindo o desenvolvimento de processos robustos e reprodutíveis. Por possibilitarem amostragens não-destrutivas, os biorreactores permitem que a cultura celular seja caracterizada ao longo do processo (por exemplo em termos de concentração e viabilidade celular, funcionalidade, pureza e perfil genético).

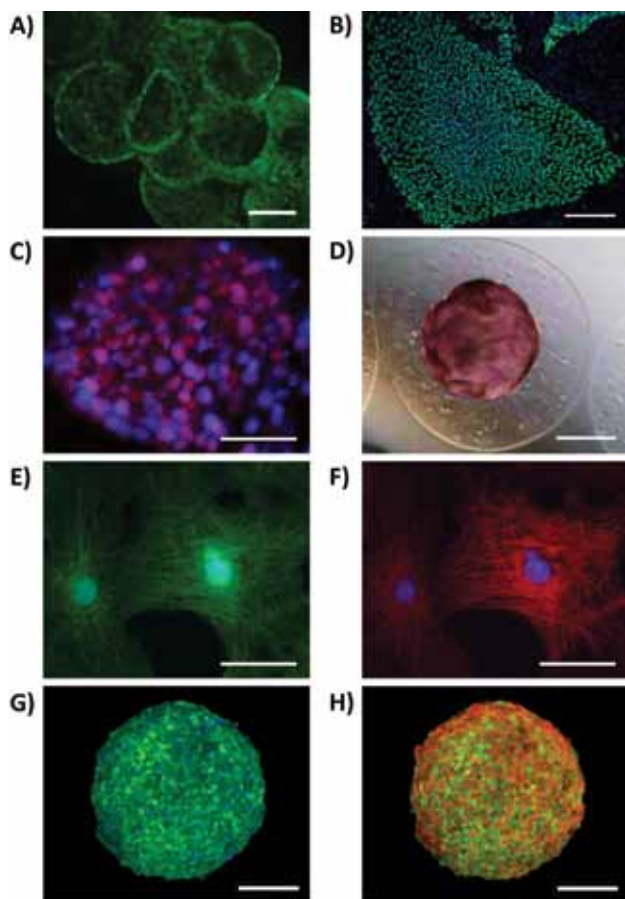


Figura 2 – Caracterização de PSCs e de cardiomiócitos derivados de PSCs. A) hESCs imobilizadas em microsuportes demonstrando o marcador de pluripotência OCT-4 (verde). B-C) Colónias de hESCs (B) e iPSCs (C) evidenciando os marcadores de pluripotência (OCT-4 – verde; Sox-2 – vermelho; Núcleos – azul). D) hESCs microencapsuladas em alginato apresentando uma marcação positiva para a fosfatase alcalina (rosa) confirmando o carácter pluripotente. E-F) Cardiomiócitos derivados de iPSCs cultivados em monocamada 2-D (marcadores específicos de cardiomiócitos: Titin – vermelho e αMHC – verde; Núcleos – azul). G-H) Agregados 3-D de cardiomiócitos (Colagénio tipo I – vermelho; αMHC – verde; Núcleos – azul). As barras de escala correspondem a 50 µm (B, E, F); 100 µm (A, D, G, H) e 200 µm (C).

o processo. As células indiferenciadas devem manter a sua pluripotência, bem como a sua estabilidade genética e epigenética, após expansão. Os derivados de hPSCs devem expressar os marcadores característicos deste tipo de células e serem funcionais *in vitro* e *in vivo*. Além disso, todos os procedimentos (o isolamento, a propagação, a diferenciação e a criopreservação) bem como todos os componentes para cultura celular (matrizes, meios de cultura e de criopreservação, suplementos) devem ser compatíveis com as boas práticas de manufatura (GMP, *Good Manufacturing Practice*) e cumprir a regulamentação proposta pela Agência de Alimentos e Medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*) ou pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA).

Um dos maiores desafios na cultura de hPSCs consiste em compreender e conseguir controlar os mecanismos de decisão celular. Na realidade o destino das células estaminais é estritamente dependente de estímulos provenientes do ambiente extracelular. Estes estímulos afectam as células em diferentes escalas temporais e espaciais e podem conduzir a destinos celulares específicos, como promover e controlar a proliferação, diferenciação ou morte celular. Os estímulos

que regem predominantemente o destino das células estaminais provêm: I) da matriz extracelular, II) de factores solúveis, III) de interações célula-célula, IV) de forças físicas e V) de factores físico-químicos [1]. Portanto é essencial identificar e compreender estes estímulos de modo a recrear o microambiente ideal para cultivar hPSCs e derivados.

As hPSCs são tradicionalmente cultivadas em monocamadas bi-dimensionais (2-D), em placas (Fig. 1 A) ou nos designados T-flasks. No entanto, estes sistemas de cultura estão associados a elevada heterogeneidade, baixa reprodutibilidade, impossibilidade de monitorização e controlo ambiental e baixos rendimentos de produção, o que limita a sua utilização numa escala clínica ou industrial. Do ponto de vista industrial, a forma mais robusta e eficaz de produzir produtos baseados em hPSCs consiste em cultivar estas células em sistemas dinâmicos que permitam às células adquirir uma conformação celular tridimensional (3-D) semelhante à encontrada nos tecidos. Alguns exemplos de culturas 3-D, são os agregados celulares [8, 9], a imobilização das células em microsuportes [10] ou a microencapsulação de células em hidrogéis [11] (Fig. 1 A). De facto, as estratégias de cultura 3-D ao proporcionarem um contexto celular mais semelhante ao próprio microambiente das células, melhoram significativamente a viabilidade e a funcionalidade das mesmas, oferecendo um maior grau de robustez, consistência e previsibilidade ao processo. A cultura de células em 3-D faz-se normalmente em sistemas dinâmicos, como por exemplo em biorreactores. Estes sistemas apresentam inúmeras vantagens para o cultivo de células estaminais, nomeadamente: permitem a monitorização e o controlo das condições ambientais, uma mistura homogénea da cultura, amostragens não-destrutivas para caracterizar com regularidade a cultura e a produção em larga escala. A utilização de biorreactores representa assim um elemento-chave para o desenvolvimento de bioprocessos automatizados, padronizados, rentáveis e reprodutíveis (Fig. 1 B). Actualmente, existe uma grande variedade de biorreactores disponíveis para cultivo de hPSCs, como por exemplo, biorreactores de tanque agitado, biorreactores rotativos, dispositivos microfluídicos e sistemas descartáveis com configurações específicas tais como os biorreactores Wave e PBS (*Pneumatic Bioreactor System*).

A necessidade crescente de hPSCs e derivados para aplicações terapêuticas exige também o desenvolvimento de metodologias de criopreservação eficientes que não comprometam a viabilidade, as características e potencial das células. Para uma vasta variedade de tipos de células o processo de criopreservação é relativamente simples e eficiente, no entanto para sistemas celulares sensíveis e complexos tais como a cultura de hPSCs em monocamada ou em 3-D, os processos de criopreservação actualmente existentes afectam a viabilidade e a funcionalidade das células após o congelamento.

Na Unidade de Tecnologia de Células Animais (iBET), o nosso grupo tem vindo a desenvolver bioprocessos para a produção e criopreservação de hPSCs e derivados. Essencialmente têm sido desenvolvidas estratégias integradas que combinam métodos de cultura 3-D com o controlo e manipulação de

diversas variáveis críticas ao bioprocesso utilizando biorreactores. Estudos anteriores revelaram que o controlo do oxigénio dissolvido (30% de ar saturado) e a utilização de um sistema de perfusão contínua, são parâmetros fundamentais para a expansão de hESCs no seu estado indiferenciado. Estas condições ambientais em combinação com a cultura 3-D em microsuportes (Fig. 2 A) permitiram um melhoramento de 12 vezes no rendimento de expansão celular relativamente aos métodos de cultura 2-D em sistema estático (Fig. 2 B-C) [10]. A tecnologia de microencapsulação de células em alginato revelou também ser importante para melhorar o processo de expansão de hESCs e desenvolver um bioprocessos integrado com protocolos de criopreservação. Esta estratégia garantiu rendimentos de expansão celular elevados (aumento de cerca de 20 vezes na concentração celular) e percentagens de viabilidade celular altas após a criopreservação (Fig. 2 D) [11]. Mais recentemente, o nosso grupo tem-se focado na implementação de bioprocessos integrados e escalonáveis para expansão, diferenciação dirigida e purificação de derivados de hPSCs, como por exemplo cardiomiócitos (Fig. 2 E-F). Para tal têm sido utilizados sistemas de cultura 3-D (agregados celulares, Fig. 2 G-H) e biorreactores onde as condições ambientais essenciais para promover a diferenciação de hPSCs em cardiomiócitos funcionais podem ser minuciosamente controladas e monitorizadas.

Pretende-se que as estratégias inovadoras desenvolvidas pelo nosso grupo e o conhecimento obtido nestes projectos proporcionem uma nova forma de originar e dinamizar plataformas “ideais” e flexíveis para a produção de hPSCs e derivados, possíveis de serem transferidos para a clínica / indústria. Neste momento, as metodologias desenvolvidas estão a ser adaptadas para a produção de outros derivados de hPSCs (por exemplo, neurónios e hepatócitos), potenciando assim um amplo espectro de aplicações destas células em medicina regenerativa, em toxicologia e no rastreio de drogas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à empresa Cellartis (Suécia) e ao Dr. Tomo Saric (Instituto de Neurofisiologia, Universidade de Cologne, Alemanha) por cederem as células estaminais utilizadas nos estudos apresentados. Estes trabalhos foram financiados pela União Europeia (através dos projectos Hyperlab

(223011) e CARE-MI (HEALTH-2009_242038)) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (PTDC/BIO/72755/2006). C. C. agradece à FCT a bolsa de doutoramento (SFRH / BD / 51573 / 2011).

Referências

- [1] Serra M, Brito C, Correia C, Alves PM: Process engineering of human pluripotent stem cells for clinical application. *Trends Biotechnol.* 2012, 30:1–10.
- [2] Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A: Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat. Med.* 2004, 10 Suppl:S42–S50.
- [3] Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE: Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat. Biotechnol.* 2008, 26:443–452.
- [4] Pawani H, Bhartiya D: Pluripotent stem cells for cardiac regeneration: Overview of recent advances & emerging trends. *Indian J. Med. Res.* 2013, 137:270–82.
- [5] Lund RD, Wang S, Klimanskaya I, Holmes T, Ramos-Kelsey R, Lu B, Gorman S, Bischoff N, Sauve Y, Lanza R: Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning Stem Cells* 2006, 8:189–199.
- [6] Jing D, Parikh A, Canty JM, Tzanakakis ES: Stem cells for heart cell therapies. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2008, 14:393–406.
- [7] Fujikawa T, Oh S-H, Pi L, Hatch HM, Shupe T, Petersen BE: Teratoma Formation Leads to Failure of Treatment for Type I Diabetes Using Embryonic Stem Cell-Derived Insulin-Producing Cells. *Am. J. Pathol.* 2005, 166:1781–1791.
- [8] Brito C, Simão D, Costa I, Malpique R, Pereira CI, Fernandes P, Serra M, Schwarz SC, Schwarz J, Kremer EJ, Alves PM: Generation and genetic modification of 3D cultures of human dopaminergic neurons derived from neural progenitor cells. *Methods* 2012, 56:452–60.
- [9] Serra M, Brito C, Costa EM, Sousa MF, Alves PM: Integrating human stem cell expansion and neuronal differentiation in bioreactors. *BMC Biotechnol.* 2009, 9:82.
- [10] Serra M, Brito C, Sousa MFQ, Jensen J, Tostões R, Clemente J, Strehl R, Hyllner J, Carrondo MJT, Alves PM: Improving expansion of pluripotent human embryonic stem cells in perfused bioreactors through oxygen control. *J. Biotechnol.* 2010, 148:208–215.
- [11] Serra M, Correia C, Malpique R, Brito C, Jensen J, Bjorquist P, Carrondo MJT, Alves PM: Microencapsulation Technology: A Powerful Tool for Integrating Expansion and Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS One* 2011, 6:1–13.



Visite o nosso site
www.spbt.pt

Células estaminais pluripotentes induzidas – elenco promissor para o futuro da medicina

Ana C. Matias^{1,2}, Ivette Pacheco-Leyva^{1,2}, Gisela Machado-Oliveira^{1,2}, Daniel V. Oliveira^{1,2}, José Bragança^{1,2}

¹Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

²IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centro de Biomedicina Molecular e Estrutural, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

E-mail: jebraganca@ualg.pt

Resumo

Novas estratégias terapêuticas baseadas em células estaminais, para corrigir ou regenerar tecidos e órgãos disfuncionais, têm sido implementadas ao longo das últimas décadas, tendo um futuro promissor no tratamento de doenças degenerativas para as quais não existem tratamentos eficazes. As células estaminais pluripotentes, com a capacidade de proliferar indefinidamente e de se diferenciar em qualquer tipo celular do organismo adulto, apresentam grande potencialidade na área da medicina regenerativa. Este artigo faz uma breve revisão sobre as células estaminais pluripotentes induzidas, com foco no processo de reprogramação e potencial terapêutico destas células.

iPSC, Novas Células Estaminais

As células estaminais adultas ou somáticas (ASC, do inglês *Adult Stem Cells*), são células localizadas nos vários tecidos do organismo adulto mantendo-se num estado indiferenciado ou não especializado. As ASC têm a capacidade de auto-renovação e de se diferenciarem em células especializadas, de modo a manter ao longo da vida, a homeostasia e as funções específicas do órgão onde estão presentes. A utilização terapêutica das ASC na reposição celular, em tecidos ou órgãos danificados, é utilizada com sucesso há vários anos, mas é limitada devido à reduzida capacidade proliferativa e de sobrevivência destas células em laboratório [1]. As células estaminais embrionárias (ESC, do inglês *Embryonic Stem Cells*), ao contrário da maioria das ASC, têm a capacidade de proliferar em cultura, tornando-se numa fonte ilimitada de células. Contudo, o risco de rejeição imune, o fato de possuírem um elevado potencial de tumorigénese e as preocupações éticas levantadas pela necessidade da destruição de embriões humanos para obtenção das ESC, limitaram a investigação e impossibilitaram a sua utilização clínica, levando a comunidade científica a encontrar alternativas para originar novas células pluripotentes. Em 2006, Shinya Yamanaka, premiado do Nobel da Medicina em 2012, e colaboradores descreveram pela primeira vez a reprogramação de células somáticas de ratinho em células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC, do inglês *Induced Pluripotent Stem Cells*) com características semelhantes às das ESC, por expressão forçada de quatro fatores de transcrição necessários para a pluripotência, Oct4, Sox2, Klf4 e Myc [2]. Esta nova estratégia de reprogramação aplicável às células humanas, tem despertado um grande interesse na comunidade científica e médica por constituir uma alternativa viável às ESC humanas, e para o desenvolvimento de terapias personalizadas, dado que estas células podem ser originadas a partir de cé-

lulas adultas do próprio paciente (Figura 1) [3]. A utilização de iPSC tem ainda a vantagem de superar as preocupações éticas ligadas à origem embrionária das ESC humanas. No entanto, as iPSC e as ESC apresentam diferenças nos seus padrões de expressão génica, e ademais, nas iPSC foram por vezes detetadas mutações inerentes ao processo de reprogramação [4], acrescentando preocupações adicionais às das ESC para a sua utilização na prática clínica. Assim, para a utilização segura das iPSC em aplicações clínicas, é necessário otimizar os procedimentos para aumentar a eficiência da reprogramação, suprimir o risco de mutagénese do processo e evitar o uso de fatores de reprogramação pró-oncogénicos e de vetores que se integram no genoma para expressão. Um enorme esforço foi já feito nesse sentido, e recentemente, a reprogramação de fibroblastos de ratinho foi conseguida apenas com compostos químicos adicionados ao meio de cultura [5].

Mecanismos Moleculares da Reprogramação

A manutenção da pluripotência é controlada por fatores de crescimento e vias de sinalização, Activina e o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) no caso das ESC humanas, e o fator inibidor de leucemia (LIF) nas ESC de ratinho. Estas vias, por sua vez, ativam uma rede de fatores de transcrição conservados nas ESC humanas e de ratinho, entre os quais Oct4, Sox2 e Nanog, são cruciais para a expressão de genes necessários à auto-renovação e impedindo a diferenciação das ESC. Outras vias de sinalização e fatores de transcrição auxiliares, como Klf4 e Myc, sinergizam com Oct4, Sox2 e Nanog. A expressão forçada de Oct4, Sox2, Klf4 e Myc (ou novas combinações de genes) em células somáticas, e o crescimento destas em condições de cultura das ESC, possibilita a reversão do estado de diferenciação das células e permite a aquisição de propriedades de pluripotên-

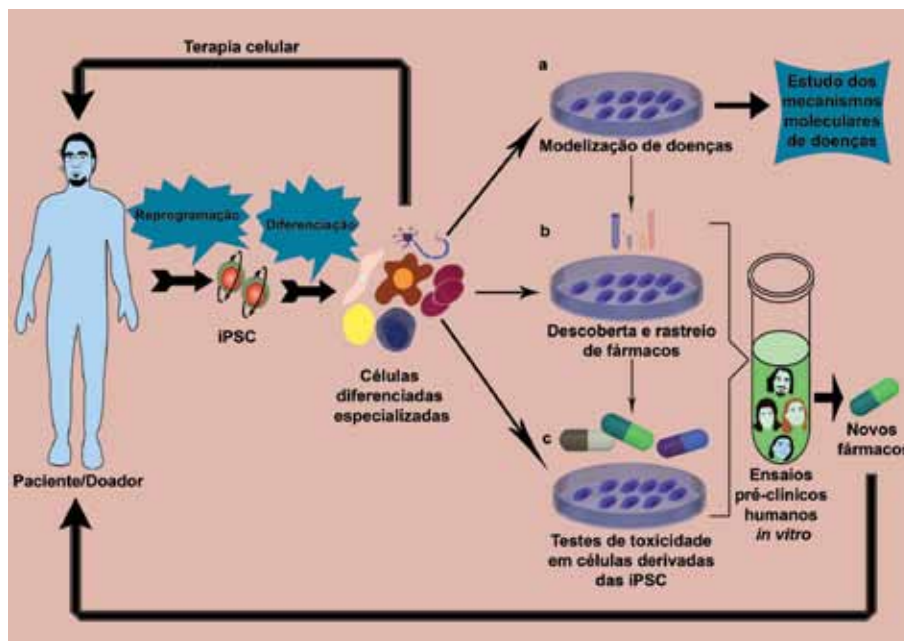


Figura 1 – iPSC humanas e as suas aplicações. As iPSC obtidas a partir de células somáticas autólogas podem ser diferenciadas no tipo celular necessário para a terapia do paciente e também para diversas aplicações *in vitro*: (a) modelização de doenças para estudar mecanismos moleculares patológicos, (b) desenvolvimento de rastreios de fármacos para terapias personalizadas, e (c) para avaliar a toxicidade de fármacos em células derivadas das iPSC.

cia em cerca de 30 dias [6]. A análise temporal da expressão génica indica que este processo ocorre em etapas sucessivas (Figura 2). A fase de iniciação, é caracterizada pelo aumento estocástico da expressão de genes envolvidos na transição mesenquimal-epitelial, proliferação celular, reparação de DNA, processamento do RNA, modificações epigenéticas, metabolismo e repressão de genes associados ao desenvolvimento embrionário [7]. Esta fase poderá resultar da ação de Myc exógeno, fator “amplificador” da expressão de genes previamente ativos nas células somáticas, e de Klf4 exógeno que limita os efeitos apoptóticos e de transformação induzidos por Myc. Estas mudanças de expressão génica levam a maior parte das células a entrar em senescência, apoptose ou a transdiferenciar (originar células somáticas com funções distintas). Contudo, algumas células são encaminhadas para o processo de reprogramação, entrando numa fase intermédia caracterizada pela ativação estocástica de genes de pluripotência, enzimas da glicólise, e ativação transitória de reguladores do desenvolvimento. Esta etapa é inicialmente promovida por uma ligação não específica dos fatores Oct4, Sox2 e Klf4 exógenos a regiões do genoma transcricionalmente inativas ou pouco ativas, desencadeando a abertura generalizada da cromatina e aumentando a probabilidade de ativação de genes de pluripotência reprimidos nas células somáticas. A ativação da expressão endógena de Sox2 conclui a fase intermédia, e marca o início da fase de maturação e estabilização das células destinadas à reprogramação em iPSC. Sox2 coordena a ativação e estabilidade da expressão dos genes de pluripotência, em particular Nanog e Oct4 [8]. Em conjunto, os fatores Sox2, Nanog e Oct4 endógenos cooperam para restringir a expressão dos genes específicos das ESC, promovendo a auto-renovação e pluripotência das iPSC sem a necessidade de fatores exógenos. Nesta fase ocorre ainda o silenciamento de transgenes usados para a reprogramação, o estabelecimento das marcas epigenéticas es-

pecíficas das ESC e a reorganização do citoesqueleto e dos cromosomas. Parte do nosso trabalho de investigação tem por objetivo a compreensão do papel de novos fatores auxiliares nos mecanismos de regulação da auto-renovação e de proliferação das ESC, e determinar o benefício desses fatores no processo de reprogramação.

iPSC e suas Aplicações Terapêuticas

Vários ensaios experimentais em animais mostraram o grande potencial terapêutico das células derivadas de iPSC humanas, mas a sua aplicação clínica apenas começa a ser implementada. Nos Estados Unidos, está agora a ser desenvolvido um ensaio clínico utilizando plaquetas derivadas de iPSC na trombocitopenia refratária. As plaquetas são fragmentos citoplásmicos anucleados que podem ser irradiados para remoção de eventuais células contaminantes. Outro ensaio clínico está a decorrer com queratinócitos derivados de iPSC corrigidos geneticamente para tratar epidermólise bulhosa, uma doença rara da pele. No Japão, investigadores receberam a aprovação do governo para realizar um ensaio clínico utilizando epitélio pigmentado da retina derivado de iPSC, para tratar uma forma de degeneração da mácula relacionada com a idade [9].

Além do potencial terapêutico, existem outras aplicações desta tecnologia inovadora, tal como a modelização de doenças *in vitro* utilizando iPSC reprogramadas a partir de doentes [3]. As iPSC, ou células delas derivadas, constituem uma ferramenta biotecnológica atraente para a indústria farmacêutica, para efetuar rastreios *high throughput* e identificar medicamentos adequados para a correção dos distúrbios celulares subjacentes ao estado patológico, para substituir os testes em animais e determinar a toxicidade de novos fármacos em células humanas representativas das doenças alvo.

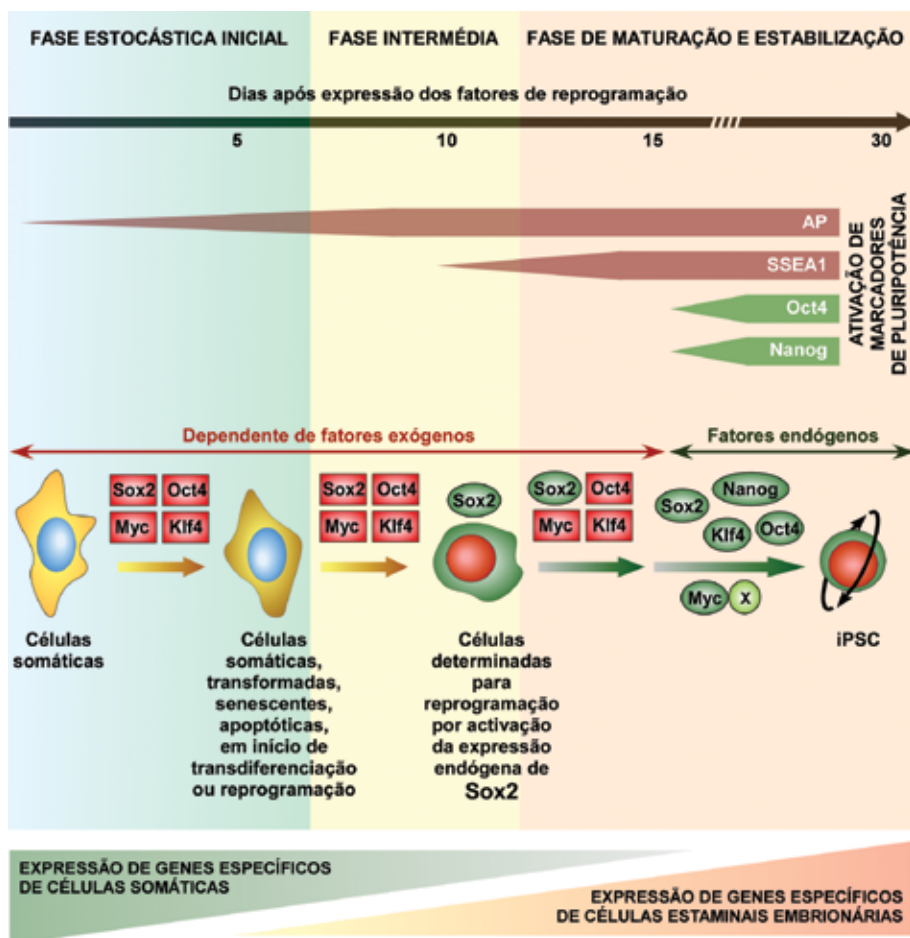


Figura 2 – Reprogramação de células somáticas em iPSC. Ver texto principal para mais detalhes. A expressão de Sox2, Oct4, Myc e Klf4 em células somáticas cultivadas na presença de LIF (células de rato) ou bFGF (células humanas) inicia o processo de reprogramação. As células seguem depois para uma fase intermediária que é finalizada pela ativação de Sox2 endógeno. Sox2 determina a fase de maturação e estabilização em conjunto com Nanog e Oct4, promovendo a auto-renovação e pluripotência das iPSC sem mais necessitar de fatores exógenos. As iPSC são caracterizadas pela expressão de marcadores de pluripotência, tal com Oct4 e Nanog, a fosfatase alcalina (AP) e o marcador embrionário de superfície (SSEA1). A ativação temporal destes genes está indicada.

Conclusões

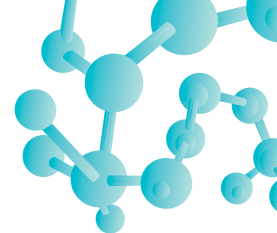
As iPSC abrem novas portas para a compreensão dos mecanismos subjacentes a patologias e oferecem perspectivas novas de tratamento de inúmeras doenças. As iPSC já se encontram em ensaios clínicos, no entanto é necessário compreender os mecanismos moleculares que regem a sua reprogramação e diferenciação para aproveitar plenamente o seu potencial terapêutico.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro “Programa de Investigação em Medicina Regenerativa” do Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, e à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) por financiar o projeto PTDC/SAU-ENB/111702/2009 e as bolsas SFRH/BPD/74807/2010 (GMO) e SFRH/BD/62054/2009 (IPL).

Referências

- [1] Bragança J, Tavares Á, Belo JA. Células estaminais e medicina regenerativa - Um admirável mundo novo. Canal BQ. 2010;7:4-17.
- [2] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell. 2006;126:663-76.
- [3] Bellin M, Marchetto MC, Gage FH, Mummery CL. Induced pluripotent stem cells: the new patient? Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13:713-26.
- [4] Gore A, Li Z, Fung H-L, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. Nature. 2011;471:63-7.
- [5] Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. Science. 2013;341:651-4.
- [6] Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. Genes & Development. 2010;24:2239-63.
- [7] Buganim Y, Faddah DA, Jaenisch R. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. Nat Rev Genet. 2013;14:427-39.
- [8] Buganim Y, Faddah Dina A, Cheng Albert W, Itskovich E, Markoulaki S, Ganz K, et al. Single-Cell Expression Analyses during Cellular Reprogramming Reveal an Early Stochastic and a Late Hierarchic Phase. Cell. 2012;150:1209-22.
- [9] Garber K. Inducing translation. Nature biotechnology. 2013;31:483-6.



No caminho para a aplicação terapêutica das células estaminais, extraídas a partir da matriz do cordão umbilical (UCX[®]), na regeneração do músculo cardíaco após enfarte do miocárdio

Jorge M. Santos, Rita N. Bárcia, Mariana Filipe, Mariana Teixeira, Pedro Cruz e Helder Cruz

ECBio, Investigação e Desenvolvimento em Biotecnologia S. A.

Rua Henrique Paiva Couceiro, 27, 2700-451 Amadora, Portugal

E-mail: miguel.santos@ecbio.com

O enfarte agudo do miocárdio ocorre quando a obstrução de uma artéria coronária restringe gravemente o fornecimento de sangue a uma região do coração. Mesmo quando a lesão é menos extensa, o coração pode não ser capaz de bombear adequadamente; produzindo-se então uma insuficiência cardíaca. O coração lesionado pode dilatar-se enfraquecendo desta forma o parênquima cardíaco.

Os números revelam que, diariamente, as doenças cardiovasculares causam a morte a mais de 100 portugueses, o que representa cerca de 35 por cento da mortalidade total anual, sendo as principais causas os acidentes vasculares cerebrais (AVC) e o enfarte do miocárdio (ataque cardíaco). Ainda assim, e de acordo com Fundação Portuguesa de Cardiologia, as doenças cardiovasculares estão a causar menos mortes em Portugal mas o número de incapacidades é cada vez maior, o que representa um encargo muito elevado para o SNS [1-7]. Não nos podemos esquecer que 17% da população portuguesa diz ser hipertensa, 19% da população ainda diz ser fumadora de mais de 20 cigarros por dia, e que 50% da população portuguesa apresenta excesso de peso. Sendo também Portugal um dos países da União Europeia onde mais calorias se consomem, e onde menos actividade física se pratica, podemos afirmar que o nosso país apresenta todos os potenciais factores de risco para doenças cardiovasculares, com índices bastante alarmantes [2-6]. O parênquima do coração é um tecido com reconhecida capacidade de auto-regeneração. Sabe-se hoje que esta capacidade é devida, em grande parte, à acção de células com carácter estaminal, sejam elas precursoras cardíacas existentes no próprio parênquima, ou de carácter mesenquimatoso, recrutadas a partir da medula óssea ou de outros tecidos adjacentes. Seja qual for a sua origem, a utilização de células estaminais com o fim de promover a regeneração do músculo cardíaco pós-enfarte é hoje tema de variadíssimos programas de investigação na área da medicina regenerativa.

A controvérsia gerada pelas células estaminais embrionárias (ESC), e a mais recente descoberta que as células pluripotentes induzidas (iPS) têm grande instabilidade genómica após expansão [8], tem conduzido cada vez mais à investigação sobre o potencial das células estaminais somáticas, adultas

e neonatais, como alternativas terapêuticas. O dogma que considerava o coração como um órgão pós-mitótico foi questionado pela demonstração de uma contínua regeneração dos cardiomiócitos constituintes do parênquima cardíaco através da diferenciação de células precursoras cardíacas residentes, e de células estaminais mesenquimatosas provenientes da medula óssea (BM-MSCs). Diversos modelos experimentais foram desenvolvidos no sentido de se proceder à transplantação de células estaminais para regiões isquémicas ou não-funcionais do miocárdio. Consequentemente, nos últimos anos, tem sido explorada a hipótese de utilizar células estaminais somáticas adultas, com uma incidência lógica nas BM-MSCs, dado o seu carácter autólogo (do próprio para o próprio), e por se pensar que naturalmente participassem já activamente no processo regenerativo [9-10]. A regeneração do miocárdio após enfarte, através da utilização das MSCs, pode ser conseguida por duas abordagens distintas. A primeira refere-se a um transplante autólogo em que as células são isoladas da medula óssea (ou de outro tecido adulto do próprio paciente, como seja o tecido adiposo) e re-injectadas directamente no miocárdio ou corrente sanguínea algum tempo após o enfarte [9-10]. A segunda baseia-se na mobilização de células estaminais. Para tal é necessário estimular o desenvolvimento de populações específicas na medula óssea que seguidamente são encaminhadas para a região do enfarte podendo sofrer transdiferenciação *in situ* [11-18].

Os resultados do primeiro ensaio clínico (Fase I) foram publicados em 2004, apenas 2 anos após a capacidade de transdiferenciação das BM-MSCs em cardiomiócitos ter sido reportada pela primeira vez [19]. Depois disso, muitos ensaios clínicos de Fase I/II têm vindo a ser realizados envolvendo um número de pacientes que já ascende às centenas. Na globalidade, ficou demonstrado que a infusão intracoronária de BM-MSCs em pacientes com enfarto agudo do miocárdio é segura [20-24]. Relativamente ao benefício, os resultados demonstram, em média, um pequeno incremento positivo funcional (fracção de ejeção ventricular), principalmente em pacientes padecendo de patologia cuja gravidade é média/severa. Em pacientes com patologia de baixa gravidade, o efeito, em média, não é significativo. A conclusão principal

é que a variabilidade é tremenda em termos de efeito terapêutico, e essa variabilidade é devida essencialmente à natureza da medula óssea, assim como de outras fontes autólogas de MSCs para terapia, como sejam o sangue periférico e o tecido adiposo [20-24].

Mais especificamente, em termos práticos, a utilização das BM-MSCs apresenta algumas limitações importantes, como sejam: I) o processo de obtenção da medula óssea a partir do próprio paciente não deixa de ser um processo invasivo, acarretando algum risco; II) as BM-MSCs existem em pequenas quantidades relativas na medula óssea (as BM-MSC são apenas 1:10.000 células totais da medula óssea), e a sua multiplicação está limitada por uma senescência precoce relativamente a algumas alternativas. Isto faz com que se opte por um preparado heterogêneo e indefinido que não dá garantias de sucesso; III) a eficiência com que se isolam BM-MSCs viáveis a partir de doentes debilitados, por vezes com historial clínico complexo, é muito baixa e, para além disso, a eficiência de isolamento de BM-MSCs está ainda relacionada de forma negativa com idade do paciente IV) a necessidade de infra-estrutura em ambiente hospitalar e *know how* técnico e regulamentar dos clínicos para isolar e expandir BM-MSCs a partir duma população celular altamente heterogênea, assim como para elaborar um preparado farmacêutico em tempo útil para o paciente, acarreta questões técnicas e logísticas difíceis de ultrapassar. Como tal, opta-se normalmente por um preparado de medula óssea, contendo uma fracção de células mononucleadas da medula contendo uma população heterogênea de células sem qualquer definição quantitativa ou qualitativa relativamente ao conteúdo de MSCs [18-24].

O ideal seria ter acesso imediato a um produto celular, seguro, superior em termos de potência terapêutica, que estivesse armazenado e disponível sempre que necessário administrar ao paciente, sem limitações de dose e tempo para administração.

A ECBio, Investigação e Desenvolvimento em Biotecnologia, SA; é uma empresa biofarmacêutica dedicada ao desenvolvimento de medicamentos inovadores à base de células estaminais isoladas a partir de tecidos neonatais (www.ecbio.com).

Nos últimos anos, a ECBio tem vindo a focar a sua actividade na aplicação clínica do subtipo de células estaminais mesenquimatosas (*mesenchymal stem cells* - MSCs) constituintes do tecido (Geleia de Wharton) do cordão umbilical.

As MSCs são caracterizadas por terem um enorme potencial de auto-renovação, sendo capazes de se diferenciar em múltiplos tipos de células especializadas, como sejam células ósseas, células cartilaginárias, células constituintes do músculo-esquelético, células produtoras de insulina e células neurais [25]. Para além disso, as MSCs têm a capacidade de promover a regeneração autóloga de tecidos através de mecanismos parácrinos, envolvendo a secreção de factores tróficos como as citocinas e outros factores de crescimento que estimulam a acção regenerativa de células precursoras residentes nos tecidos lesados, assim como o recrutamento de outras células circulantes [25-26].

A ECBio desenvolveu um protocolo de isolamento de MSCs a partir do tecido do cordão umbilical (matriz ou Geleia de Wharton) bem definido em termos do número de células obtidas por massa de tecido inicial [27]. O processo de obtenção de cordões umbilicais, considerados resíduos cirúrgicos, é um processo totalmente não invasivo, não acarretando qualquer risco para o dador. Para além disso, o nível de eficiência atingido após optimização fez com este protocolo originasse uma população de células bem caracterizada a partir de 100% das amostras biológicas de cordão umbilical processadas, e em números compatíveis com o desenvolvimento de bancos de células para terapia em humanos [27]. Ao contrário das BM-MSCs, as células do tecido do cordão umbilical existem em grandes quantidades na Geleia de Wharton, não estando a sua expansão para aplicação clínica limitada por senescência celular, mesmo em situações onde a administração de doses múltiplas poderá ser necessária. A ECBio comprovou que estas células mantêm o fenótipo mesenquimal, estabilidade genómica e ausência de propensão para induzir a formação de teratomas até níveis de expansão muito elevados, bastante acima do necessário para estabelecer um *Master Cell Bank* (MCB) e *Working Cell Bank* (WCB) para terapias celulares (Figura 1) [27].

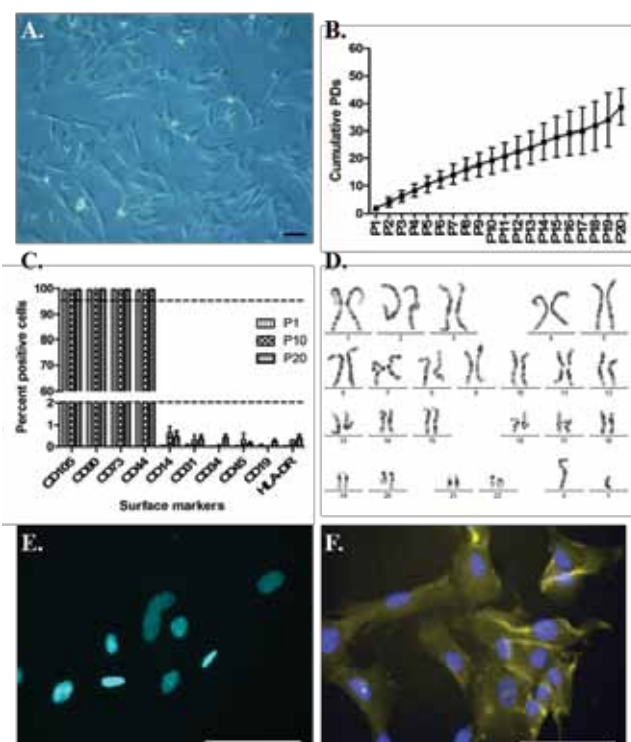


Figura 1 – A capacidade de expansão *ex vivo* em cultura do produto celular da ECBio - UCX® (A.) foi controlada sob vários pontos de vista: capacidade de expansão (B.), manutenção do fenótipo mesenquimatoso, através da análise de expressão de marcadores de superfície celular específicos para as MSC (C.); e estabilidade genómica, através da análise da estabilidade genotípica ao longo da expansão celular (D.). A caracterização do produto em termos de potência passa pela avaliação da capacidade das células se diferenciarem em células especializadas das três camadas germinativas. No caso da diferenciação em cardiomiócitos, as células foram detectadas através de imunofluorescência, utilizando um anticorpo primário contra uma proteína típica dos tecidos musculares, a Troponina T cardíaca. Para efeitos de localização das células em cultura, os núcleos celulares foram detectados com o fluorocromo DAPI. Na cultura das células controlo só é possível detectar os núcleos corados com DAPI (E.). Nas células diferenciadas é possível também observar o citoesqueleto, corado para a Troponina T. Barras de escala = 100 µm.

Estas características fazem com que este protocolo seja ideal para ser aplicado em rotina em investigação e serviços de criopreservação e terapia celular. Tanto os aspectos técnicos como as aplicações do método estão protegidos por patente e constituem a plataforma tecnológica MATRIXSTEM® da ECBio [27]. Recentemente, derivou a partir da plataforma MATRIXSTEM® o registo de marca do primeiro produto terapêutico à base de células estaminais em Portugal - UCX®. A marca UCX® foi criada no sentido da aplicação clínica, mais precisamente, o método patenteado e protegido por patentes sob o registo MATRIXSTEM® foi adaptado para a produção dum produto medicinal de terapia avançada (*Advanced Therapy Medicinal Product* - ATMP), de acordo com as directivas Europeias [28-29]. O registo nacional e internacional da marca UCX® foi um dos principais resultados obtidos a partir dos projectos QREN 2008/1467 (TERACEL) e QREN 2009/5294 (CARDIOCEL), promovidos pela ECBio.

Estes projectos permitiram também reunir evidências científicas que suportam não só aspectos de segurança/qualidade, mas também as especificidades relacionadas com a potência do produto UCX®, como seja a sua capacidade de diferenciação cardiomiocítica (Figura 1). A ECBio foca agora a sua intervenção em áreas que claramente tiram partido das propriedades alogénicas (ausência de imunogenicidade), imunossupressoras do produto UCX®, claramente comprovadas em colaboração com a Unidade de *Cellular Immunology* (IMM.FMUL) [30].

Mais recentemente, e tirando desta feita maior partido das propriedades pró-angiogénicas e de recrutamento de outras MSCs circulantes do produto UCX®, a ECBio reuniu, em colaboração com o Grupo de Novas Terapias (INEB.UP), fortes evidências relativas ao efeito terapêutico que o produto UCX® pode ter na regeneração do músculo cardíaco. Os estudos já efectuados com administração do produto UCX® em modelos de murganho, para o enfarte do miocárdio, demonstraram claramente que o tratamento promove um aumento da capacidade de contracção ventricular, assim como a vasculogénese na zona lesada. Para além disso, o produto UCX® protege os cardiomiócitos da morte programada e induz a proliferação de células progenitoras cardíacas *in vitro* (resultados submetidos para publicação internacional). A importância destes resultados, assim como da descoberta dum mecanismo pelo qual as células na base do produto UCX® são capazes de recrutar outras células mesenquimais circulantes *in vivo*, trabalho este realizado em colaboração com o grupo de *Translational Medical Oncology, Health Research Institute of Santiago* (IDIS); *Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela/SERGAS*, vieram reforçar a opção estratégica da ECBio pela investigação translacional, e pelo posicionamento da sua acção na área cardiovascular.

A ECBio arranca agora com uma nova fase pré-clínica deste seu projecto, que consiste na adaptação do método de isolamento e preparação do seu produto celular para condições de boas práticas de fabrico (GMP). Far-se-á depois a caracterização dos respectivos *Master* e *Working Cell Banks* (MCB e WCB) que auspiciamos levará à primeira certificação ATMP em Portugal.

A ECBio está presentemente a desenvolver várias aplicações terapêuticas com base nas UCX®, maioritariamente em fase pré-clínica, e pretende iniciar ensaios clínicos nos próximos dois anos.

Agradecimentos

A ECBio agradece a todos os seus colaboradores que têm até ao momento acreditado e contribuído para que, em conjunto, tenhamos chegado ao ponto de concluir acerca da Segurança, Qualidade e Potência do produto UCX®. São eles o Grupo de Terapia Celular e Genética (Hospital Universitário Karolinska.SE), o Grupo de Novas Terapias (INEB.UP), o Grupo de *Nanomedicines and Drug Delivery Systems* (NanoDDS.iMed.UL), a Unidade de *Cellular Immunology* (IMM.FMUL), o Departamento de *Gene Regulation and Differentiation* (Helmholtz-Centre for Infection Research, Braunschweig.DE), o Grupo de *Chemical Biology and Toxicology* (iMed.UL), o Grupo de *Translational Medical Oncology, Health Research Institute of Santiago* (IDIS.Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela/SERGAS.ES), a Unidade de Microscopia Electrónica do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Curry Cabral, E.P.E., e o Departamento de Clínicas Veterinárias, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS - CECA/ICETA.UP); à empresa Cytothera, S.A., (Grupo Medinfar, Amadora.PT); Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC.Oeiras); Grupo de *Neurobiology of Action*, Fundação Champalimaud, Lisboa; o Hospital de São Bernardo, Centro Hospitalar de Setúbal, E.P.E.; o HPP Hospital de Cascais; o Hospital de Santa Maria – Lisboa; e a Clínica Médica de Ginecologia Ginetrícia, Lisboa.

A ECBio agradece ainda ao Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional - PO Lisboa: QREN SI&DT 2008/5294; QREN SI&DT 2008/1467; QREN SI&DT 2012/24765; QREN SI&DT 2013/T353000690-00021605; FCT - PTDC/SAU-TOX/110457/2009; Comissão Europeia (FP6) LSHB-CT-2007-037365; (FP6) LSHB-CT-2005-018999, e CLINIGENE, *Club of Interest*: LSHB-CT-2006-018933.

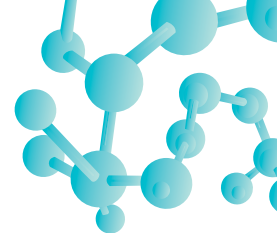
Referências

- [1] Direcção Geral da Saúde (2001) – Risco de Morrer em Portugal 1999. Direcção de Serviços de Informação e Análise, Divisão de Epidemiologia.
- [2] Direcção Geral da Saúde (2002) – Ganhos de Saúde em Portugal: Ponto de situação: Relatório do Director Geral e Alto Comissário da Saúde.
- [3] Direcção Geral da Saúde (1999) – Saúde Um Compromisso
- [4] Direcção Geral da Saúde (1997) – A Saúde dos Portugueses
- [5] Fundação Portuguesa de Cardiologia – www.fpcardiologia.pt.
- [6] Direcção Geral da Saúde (2002) – *Plano Nacional de Prevenção e Controlo das Doenças Cardiovasculares*. Ministério da Saúde.
- [7] Menezes *et al.* (2009) - Estudo da Prevalência de Doença Arterial Periférica em Portugal, *Angiologia e Cirurgia Vascular* 5(2) 59-68.
- [8] Gore *et al.* (2011) Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells *Journal name: Nature* Volume: 471:Pages:63–67.
- [9] Penn *et al.* (2002) Autologous cell transplantation for the treatment of damaged myocardium. *Prog Cardiovasc Dis* 45:31-2.

- [10] Tomita *et al.* (1999) Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*;100:II247-II256.
- [11] Toma *et al.* (2002) Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105:93-8.
- [12] Orlic *et al.* (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-5.
- [13] Kocher *et al.* (2001) Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature Med* 7:430-6.
- [14] Goodell *et al.* (2001) Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann NY Acad Sci* 938:208-18.
- [15] Jackson *et al.* (2001) Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107:1395-402.
- [16] Wang *et al.* (2000) Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: Feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120:999-1005.
- [17] Balsam *et al.* (2004) Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428:668-73.
- [18] Murry *et al.* (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428:664-8.
- [19] Wollert *et al.* (2004) Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364:141-8.
- [20] Schächinger *et al.* (2006) REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355:1210-21.
- [21] Assmus B *et al.* (2006) Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 355:1222-32.
- [22] Janssens *et al.* (2006) Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *Lancet* 367:113-21.
- [23] Lunde *et al.* (2006) Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355:1199-209.
- [24] Sürder *et al.* (2010) Cell-based therapy for myocardial repair in patients with acute myocardial infarction: rationale and study design of the SWISS multicenter Intracoronary Stem cells Study in Acute Myocardial Infarction (SWISSAMI). *Am Heart J*; 160:58-64.
- [25] Williams and Hare (2011) Mesenchymal Stem Cells: Biology, Pathophysiology, Translational Findings, and Therapeutic Implications for Cardiac Disease *Circ Res.* 2011;109:923-940.
- [26] Ripa *et al.* (2007) Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) trial. *Circulation*;116:124-30.
- [27] Santos *et al.* (2008) Isolation method of precursor cells from human umbilical cord. (INPI ed., vol. 103843. Portugal: Laboratórios Medinfar. ECTBio/PCT 2008/054067.
- [28] EMA guideline on the minimum quality data for certification of ATMP (EMA/CAT/486831/2008/corr, 2010).
- [29] Draft guideline on the risk-based approach according to Annex I, part IV of Directive 2001/83/EC (EMA/CAT/486831/2008/corr, 2010), de 19 Janeiro 2012, e EMA/CAT/CPWP/686637/2011, Committee for Advanced Therapies.
- [30] Santos *et al.* (2013) The role of human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells (UCX®) in the treatment of inflammatory arthritis J. *Transl. Med.* 2013;11:18 - <http://www.translational-medicine.com/content/11/1/18>).

spbt
sociedade
portuguesa de
biotecnologia

Inscreva-se na Sociedade em
www.spbt.pt



Estratégias de identificação de novos alvos para combater as infecções por *Burkholderia cepacia*

Sílvia A. Sousa², Christian G. Ramos², André M. Grilo², Joana R. Feliciano², Paulo J.P. da Costa², Jorge H. Leitão^{1,2}

¹Departamento de Bioengenharia

²Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal

E-mail: jorgeleitao@tecnico.ulisboa.pt

Resumo

As bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) são patogénicos capazes de causar infecções graves e por vezes letais, especialmente em doentes com fibrose quística. Várias infecções nosocomiais com estirpes Bcc têm sido reportadas em outros doentes, tais como doentes com cancro. A emergência de estirpes multirresistentes impõe a procura de novas soluções para a erradicação das infecções.

No presente trabalho descrevem-se duas estratégias usadas para a identificação em bactérias do Bcc, de genes envolvidos na virulência e de pequenos RNAs não codificantes. Estas estratégias visam a identificação de proteínas e vias regulatórias que possam ser exploradas como alvos no desenvolvimento racional de novas abordagens terapêuticas no combate às infecções causadas por estas bactérias.

Infecções por bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*

As bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) emergiram há cerca de 30 anos, como patogénios oportunistas em humanos, especialmente em portadores da doença genética fibrose quística (FQ) [1]. As infecções causadas por estes patogénios podem ser assintomáticas ou crónicas, causando um declínio gradual da função pulmonar. No entanto, alguns dos doentes com FQ infectados pelas bactérias do Bcc podem ainda desenvolver o “síndrome da cepacia”, que se caracteriza por uma pneumonia necrotizante acompanhada por septicemia, culminando na deterioração rápida e fatal da função pulmonar [1]. Acresce que algumas estirpes do Bcc apresentam elevada capacidade de transmissão, constituindo a hospitalização um dos principais factores de aquisição de infecção [2]. Nos últimos anos, tem-se assistido à descrição de infecções por estas bactérias noutros doentes, nomeadamente em doentes com cancro hospitalizados [2].

As bactérias do Bcc são intrinsecamente resistentes a múltiplos antibióticos, o que torna a sua erradicação muito difícil. Os mecanismos subjacentes à sua resistência a múltiplos antibióticos incluem a permeabilidade selectiva, alteração dos alvos, inactivação enzimática dos antibióticos e sobre-expressão de bombas de efluxo [3]. Estas bactérias são ainda resistentes aos péptidos antimicrobianos produzidos pelos neutrófilos [2]. Por estas razões, o tratamento das infecções é feito usando combinações de 2 e 3 antibióticos. No entanto, estas terapias raramente resultam na eliminação da infecção ou mesmo na melhoria do estado clínico dos doentes.

A identificação correcta de uma estirpe pertencente ao Bcc envolve técnicas moleculares de identificação e de execução muito especializada, como é o caso da tipagem por sequenciação de múltiplos loci (MLST), actualmente realizada unicamente por laboratórios de referência [2]. Foi recentemente demonstrado que ao longo de uma infecção crónica, os isolados iniciais de *B. cenocepacia* eram menos resistentes a antimicrobianos do que os isolados obtidos mais tardiamente, sugerindo uma adaptação da bactéria ao pulmão FQ e a um aumento da persistência [4]. Por isso, o desenvolvimento de métodos de identificação precoce e tratamento das estirpes de Bcc que possam ser utilizados em laboratórios hospitalares é urgentemente necessário.

À semelhança do que acontece com outros patogénicos, a falta de antimicrobianos eficazes para controlar as infecções causadas por Bcc impõe a necessidade de encontrar novas estratégias terapêuticas e preventivas para combater estas infecções.

Com o objectivo de identificar alvos de potencial interesse para o desenvolvimento de novas terapias, o nosso grupo de investigação desenvolveu uma estratégia multidisciplinar que envolveu a construção de uma colecção de mutantes dos isolados clínicos *B. cepacia* IST408 e de *B. cenocepacia* J2315 por mutagénesis aleatória com plasposões e a selecção de mutantes atenuados na sua virulência para o nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Fig. 1). Após confirmação da existência de uma única inserção do plasposão no genoma dos mutantes por técnicas de hibridação DNA-DNA, foi isolado o DNA genómico adjacente ao plasposão. As regiões que ladeiam o plasposão foram amplificadas por PCR e se-

MUTAGÉNESE ALEATÓRIA POR PLASPOSÕES

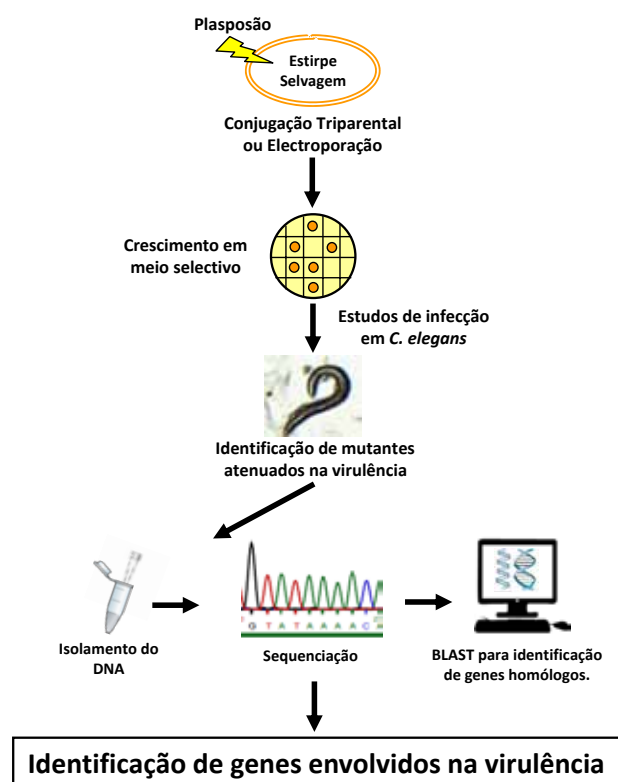


Figura 1 – Estratégia usada para a identificação de genes envolvidos na virulência das bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*.

quenciadas. As prováveis funções dos genes interrompidos, bem como a sua localização no genoma foram efectuadas recorrendo às bases de dados IMG (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>) e NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Esta estratégia permitiu identificar e caracterizar funcionalmente alguns genes envolvidos na virulência das bactérias do Bcc. No presente trabalho iremos descrever sumariamente os principais resultados obtidos para os genes *acp* e *hfq*, que codificam, respectivamente, uma proteína transportadora de grupos acilo e a chaperona de RNAs Hfq.

Proteína transportadora de grupos acilo (ACP)

As ACPs constituem uma família conservada de pequenas proteínas ácidas que desempenham um papel central na biossíntese de ácidos gordos [5]. Estas proteínas estão também envolvidas noutras vias biossintéticas como a síntese de fosfolípidos, do lipídeo A constituinte dos lipopolissacáridos e das acilhomoserina lactonas, moléculas sinalizadoras dos sistemas de quorum-sensing [5]. A existência de baixa identidade ao nível da estrutura primária das ACPs bacterianas e humanas tem levado a encarar estas proteínas como alvos atractivos para o desenvolvimento de novos anti-bacterianos [5].

Usando *C. elegans* como modelo de infecção, verificou-se que um mutante no gene *acp* era menos virulento e que a colonização do intestino do nemátodo era menor relativamente

à infecção com a estirpe selvagem de *B. cenocepacia* [5], indicando que a proteína ACP constitui um factor de virulência nestas bactérias. A caracterização fenotípica do mutante mostrou também alterações na composição total em ácidos gordos, com uma diminuição dos ácidos gordos de cadeia longa (C17 e C18) e um aumento dos de cadeia curta (C16) [5]. O mutante apresentava ainda uma capacidade reduzida para formar biofilmes e um aumento da hidrofobicidade da superfície celular [5]. A conservação de 100% ao nível das sequências primárias das proteínas ACP nas bactérias do Bcc e a existência de uma cópia única em todos os genomas (excepto numa estirpe) tornam estas proteínas um potencial alvo para o desenvolvimento de novos antimicrobianos [5]. Recentemente, foram desenvolvidos compostos denominados PMOs (conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomers) capazes de se ligar a mRNAs específicos, impedindo a sua tradução. Os PMOs são compostos por uma sequência nucleotídica específica para um mRNA, ligada a um anel de morfolina através de uma ligação do tipo fosfodiamida. Esta estrutura química é resistente à actividade de RNases e, quando conjugada com pequenos péptidos, é capaz de permear a parede bacteriana, interferindo com mRNAs para os quais a sequência nucleotídica é complementar. O tratamento de ratinhos infectados com estirpes Bcc com PMOs específicos para o gene *acp* levou à redução em 80% da mortalidade, mostrando a importância deste gene enquanto potencial alvo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos [6].

A chaperona de RNA Hfq e pequenos RNAs não codificantes (sRNAs)

Um outro mutante obtido usando a estratégia acima descrita possuía uma inserção do plasposão num gene que codifica para uma proteína Hfq. Esta proteína é um regulador pleiotrópico, cujo papel central é a mediação da interação entre sRNAs e mRNAs específicos (os seus alvos) [7]. À semelhança do observado para o gene *acp*, o mutante *hfq* também mostrou uma capacidade reduzida para matar o nemátodo *C. elegans*, indicando um papel importante deste gene na virulência. Verificou-se ainda que o mutante *hfq* apresentava uma susceptibilidade acrescida ao stress osmótico, à exposição a temperaturas elevadas e a radicais livres de oxigénio [7]. O gene *hfq* é altamente conservado nas várias espécies do Bcc. Mutantes construídos a partir de isolados clínicos pertencentes às espécies *B. cenocepacia*, *B. dolosa*, e *B. ambifaria* eram também atenuados na sua virulência para *C. elegans*, mostrando a universalidade do papel deste gene em bactérias do Bcc [7, 8].

Embora o seu papel seja ainda mal conhecido, são crescentes as referências à importância dos sRNAs na regulação de vários processos celulares, tais como a homeostase do ferro, o metabolismo energético, a regulação por quorum sensing, a adaptação e sobrevivência a alterações ambientais, a regulação da expressão de factores de virulência e adaptação ao ambiente específico do hospedeiro [8]. Os sRNAs são praticamente desconhecidos nas bactérias do Bcc. O uso de uma estratégia de copurificação do RNA total com a proteína Hfq

RNA purificado após co-precipitação com HFQ

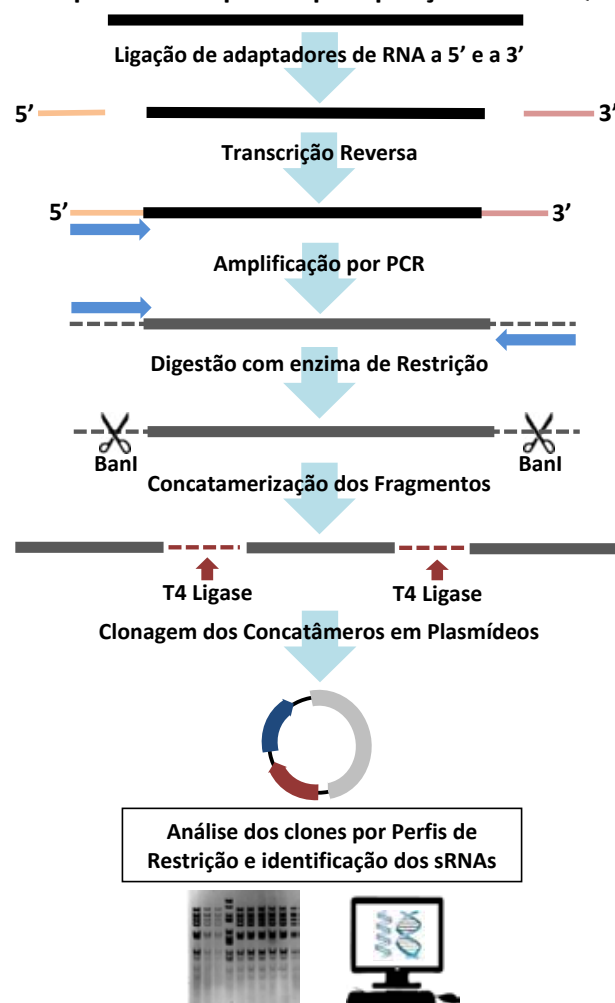


Figura 2 – Estratégia usada para a identificação experimental de sRNAs de bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*.

(Fig. 2) permitiu-nos identificar 24 novos sRNAs de um isolado clínico pertencente ao Bcc envolvido em surtos epidêmicos e morte de vários doentes [9]. Estão em curso estudos visando a sua caracterização funcional pois, contrariamente ao que acontece com as proteínas em que é possível inferir a função por comparação da sua sequência primária, essa informação é ainda escassa no caso dos sRNAs. Espera-se que estes estudos contribuam para o conhecimento mais aprofundado do papel desempenhado pelos sRNAs na biologia e patogénese das bactérias do Bcc, com o objectivo de identificar novas vias de regulação que possam ser exploradas para orientar o *design* racional de novos compostos e estratégias para o combate às infecções causadas por estes patógenos.

Conclusão

A emergência de estirpes bacterianas resistentes a múltiplos antibióticos em ambientes hospitalares e na comunidade constitui um problema crescente de saúde pública. Por outro lado é conhecido o desinvestimento feito pelas companhias farmacêuticas na descoberta de novos antibacterianos. O advento das ómicas e a disponibilidade de genomas sequenciados e de múltiplas ferramentas bioinformáticas veio revo-

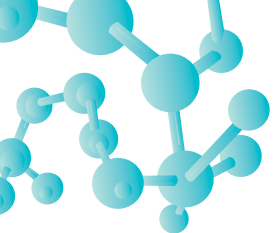
lucionar o conhecimento dos mecanismos moleculares sobre a biologia dos patógenos. Espera-se que todo este novo conhecimento permita identificar novas proteínas e vias de regulação que sejam potenciais alvos para a concepção racional de antimicrobianos, de modo a combater as infecções bacterianas.

Agradecimentos

Os autores agradecem o financiamento ao FEDER e Fundação para a Ciência e Tecnologia (Projecto PTDC/BIA-MIC/119091/2010). CGR, AMG, e JRF agradecem à FCT, respectivamente, bolsas de pós-doutoramento e de doutoramento.

Referências

- [1] Leitão JH, Sousa SA, Ferreira AS, Ramos CG, Silva IN, Moreira LM (2010) Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:31-40.
- [2] Sousa SA, Ramos CG, and Leitão JH (2011) *Burkholderia cepacia* complex: emerging multi-host pathogens equipped with a wide range of virulence factors and determinants. *Int J Microbiol*, article ID 607575.
- [3] Leitão JH, Sousa SA, Cunha MV, Salgado MJ, Melo-Cristino J, Barreto MC, Sá-Correia I (2008) Variation of the antimicrobial susceptibility profiles of *Burkholderia cepacia* complex clonal isolates obtained from chronically infected cystic fibrosis patients: a five-year survey in the major Portuguese treatment center. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27: 1101-1111.
- [4] Madeira A, Santos PM, Coutinho CP, Pinto-de-Oliveira A, Sá-Correia I (2011) Quantitative proteomics (2-D DIGE) reveals molecular strategies employed by *Burkholderia cenocepacia* to adapt to the airways of cystic fibrosis patients under antimicrobial therapy. *Proteomics* 11: 1313-1328.
- [5] Sousa SA, Ramos CG, Almeida F, Meirinhos-Soares L, Wopperer J, Schwager S, Eberl L, Leitão JH (2008) *Burkholderia cenocepacia* J2315 acyl carrier protein: a potential target for antimicrobials development? *Microb Pathog* 45: 331-336.
- [6] Greenberg DE, Marshall-Batty KR, Brinster LR, Zarembner KA, Shaw PA, Mellbye BL, Iversen PL, Holland SM, Geller BL (2010) Antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers targeted to an essential gene inhibit *Burkholderia cepacia* complex. *J Infect Dis* 201:1822-1830.
- [7] Sousa SA, Ramos CG, Moreira LM, Leitão JH (2010) The *hfq* gene is required for stress resistance and full virulence of *Burkholderia cepacia* to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Microbiology* 156: 896-908.
- [8] Ramos CG, Sousa SA, Grilo AM, Feliciano JR, Leitão JH (2011) The second RNA chaperone Hfq2, is also required for survival to stress and the full virulence of *Burkholderia cenocepacia* J2315. *J Bacteriol* 193: 1515-1526.
- [9] Ramos CG, Grilo AM, da Costa PJ, Leitão JH (2013) Experimental identification of small non-coding regulatory RNAs in the opportunistic human pathogen *Burkholderia cenocepacia* J2315. *Genomics* 101: 139-148.



Biotecnologia e inovação terapêutica: bactérias e produtos seus derivados como agentes anticancerígenos

Nuno Bernardes, Arsénio M. Fialho

Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia (IBB), Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Portugal

E-mail: afialho@ist.utl.pt

Resumo

Actualmente, tem vindo a ganhar significado crescente a utilização de bactérias selvagens ou geneticamente modificadas como agentes oncolíticos. Em paralelo, também o uso de produtos bacterianos purificados como uma nova classe de moléculas bioactivas ganha relevância como agentes anticancerígenos. Ambos representam modalidades inovadoras para o tratamento do cancro. O objectivo deste artigo é rever de forma sucinta os desenvolvimentos mais recentes e as perspectivas futuras no que diz respeito ao uso de bactérias e produtos seus derivados como agentes anticancerígenos.

Abstract

Nowadays, the use of live, attenuated or genetically-modified bacteria as oncolytic agents is emerging in the field. In parallel, purified bacterial products are also gaining relevance as new classes of bioactive products to treat and prevent cancer growth and metastasis. Both represent innovative routes for cancer treatments. The purpose of this article is to succinctly review recent developments and future prospects regarding the use of live bacteria and products as anti-cancer agents.

A Biotecnologia explorando o admirável Mundo Microbiano

Os microrganismos são seres vivos ubíquos com uma extraordinária diversidade taxonómica, fisiológica e molecular. A Biotecnologia microbiana tem vindo nas últimas décadas a explorar esta versatilidade, traduzida no estabelecimento e optimização de processos conducentes ao uso de microrganismos, isolados dos mais variados ambientes, e/ou à descoberta e posterior produção/purificação de um elevado número de moléculas únicas, capazes de encontrar novas aplicações na indústria e na medicina. Entre eles destaca-se o uso de microrganismos e produtos seus derivados (toxinas, enzimas e outras proteínas/péptidos e antibióticos) como novas e promissoras formas de terapia anticancerígena. O sucesso destas soluções terapêuticas alternativas, utilizadas de forma singular e/ou combinadas com terapias convencionais no tratamento do cancro está agora dependente da investigação de translação, nomeadamente no que se refere aos resultados a obter de um conjunto alargado de ensaios clínicos em curso na presente data.

Bactérias como agentes anticancerígenos e de marcação tumoral

As bactérias usadas como agentes anticancerígenos pertencem, entre outros, aos géneros *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella*, *Clostridium* e *Bifidobacterium* (Figura 1). Os microrganismos são utilizados como estimuladores do siste-

ma imunitário (imunoterapia), bem como em terapias direccionadas ao tecido tumoral, nomeadamente como agentes oncolíticos albergando genes que codificam toxinas e outras proteínas terapêuticas com acção anti-tumoral ou ainda como microrganismos geneticamente manipulados capazes de sintetizar enzimas que convertem pró-fármacos em fármacos efectivos com acção anticancerígena (Figura 1) [1,2]. Estes procedimentos mostram-se inovadores e porventura alternativos às terapias convencionais. No entanto, não deixa de ser pertinente destacar a dificuldade associada ao controlo de infecções sistémicas associadas à sua inoculação nos doentes/modelos animais.

Na modalidade de imunoterapia do cancro, o uso de bactérias vivas atenuadas (deficientes para genes de virulência), inoculadas no tecido tumoral, promovem um forte estímulo local e sistémico do sistema imunitário, conducente à produção de citocinas (interleucinas, Factor de Necrose Tumoral e Interferão), as quais conduzem à inibição do crescimento tumoral. Este incremento pode ainda ser valorizado pelo uso de estirpes atenuadas albergando genes que codificam proteínas do próprio sistema imunitário. De entre as várias estratégias/bactérias usadas, o caso de maior sucesso, com uso na prática clínica, diz respeito à terapia com *Mycobacterium bovis* (BCG - Bacilo de Calmette-Guérin) para tratamento/prevenção de recorrência de determinados tipos de tumores da bexiga [3].

No que se refere ao uso de bactérias como vectores para a síntese e libertação direccionada de toxinas e outras prote-

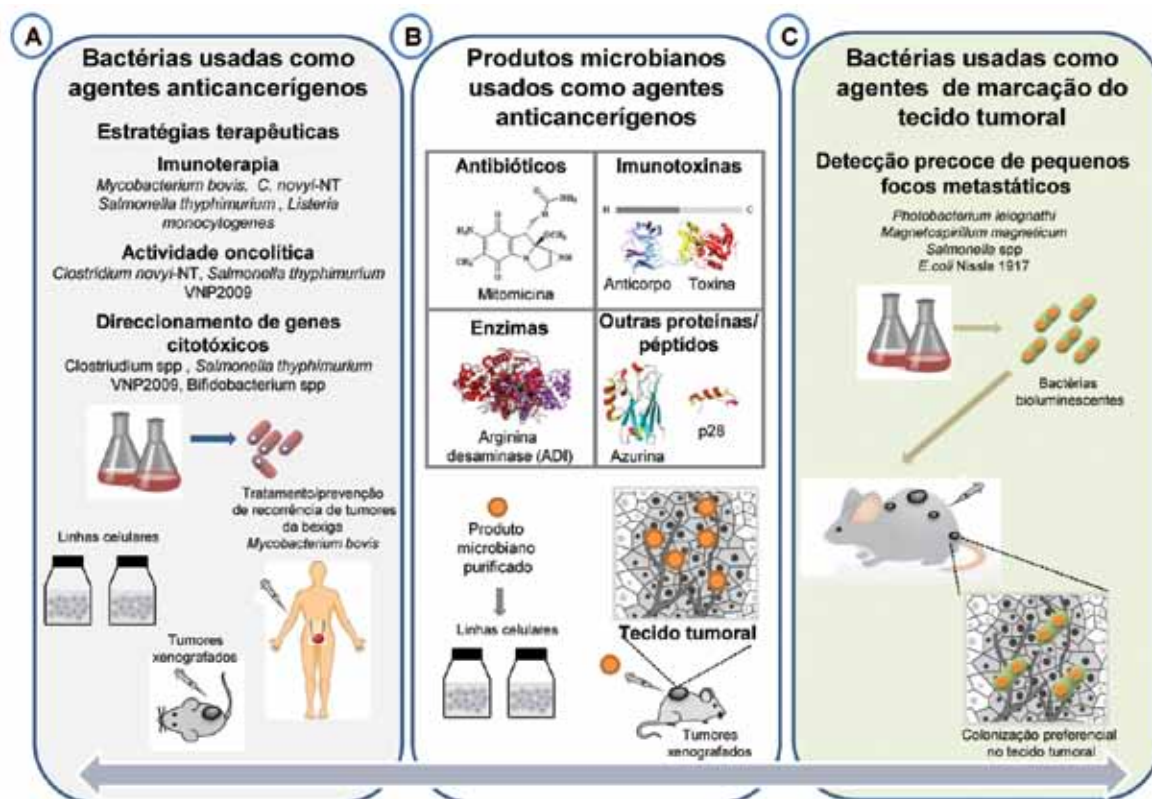


Figura 1 – (A) – Bactérias atenuadas e geneticamente manipuladas usadas *in vitro* e *in vivo* (modelos animais e espécie humana) em terapia anticancerígena, nomeadamente como agentes de imunoterapia, como agentes oncolíticos e como vectores para transporte de fármacos ou pró-fármacos. (B) – Produtos bacterianos purificados (antibióticos, imunotoxinas, enzimas e outras proteínas/péptidos) usados como agentes anti-tumorais. (C) – Uso de bactérias como agentes de marcação do tecido tumoral.

ínas com acção anticancerígena ou como forma de activar pró-fármacos em drogas efectivas, são também promissores os resultados alcançados. Nestas duas modalidades terapêuticas, recorre-se ao uso de bactérias anaeróbias estritas ou facultativas, designadamente espécies dos géneros *Clostridium*, *Bifidobacterium* e *Salmonella*, explorando deste modo a localização, crescimento preferencial e eventual internalização das bactérias no tecido tumoral, o qual é caracterizado por um microambiente de hipoxia (baixo teor de oxigénio) [2]. De entre os vários procedimentos utilizados, destacam-se duas terapias, testadas em vários modelos animais e ambas submetidas a ensaios clínicos. A primeira, designada TA-PET (*Tumour Amplified Protein Expression Therapy*) usa uma estirpe atenuada de *Salmonella typhimurium* (VNP20009), a qual, após colonização preferencial no tecido tumoral, sobre-expressa o gene que codifica para a enzima citosina desaminase, necessária à transformação do pró-fármaco 5-FC (5-fluorocitosina) em 5-FU (5-fluorouracilo), um potente fármaco anticancerígeno. Deste modo, a administração combinada da bactéria e do pró-fármaco, conduz ao crescimento localizado da bactéria no tecido tumoral com a consequente síntese de 5-FU, capaz de promover a regressão tumoral [4]. A segunda terapia, designada COBALT, revela uma considerável sinergia na acção citotóxica sob as células tumorais e recorre à administração de esporos da estirpe atenuada anaeróbica *Clostridium novyi*-NT em conjunto com a administração/uso de agentes de quimio ou radioterapia [5].

Para além do uso dos microrganismos recombinantes como agentes anticancerígenos, também tem vindo a ganhar des-

taque a sua utilização como agentes de marcação do tecido tumoral em modelos animais, principalmente de pequenos focos metastáticos. Esta aplicação baseia-se no facto dos microrganismos colonizarem de forma preferencial o tecido tumoral e deste modo, por recurso a técnicas de bioluminescência, fluorescência ou ressonância magnética, encontrar formas expeditas da sua detecção precoce [6].

Produtos de origem microbiana usados como agentes anticancerígenos

Para além do uso dos microrganismos vivos atenuados como agentes anticancerígenos, ganha cada vez mais relevância a pesquisa de novos produtos bioactivos de origem bacteriana capazes de apresentar acção anti-tumoral. Nesta categoria tem vindo recentemente a ganhar significado a aplicação de técnicas de metagenómica que permitem descobrir novas moléculas terapêuticas provenientes de microrganismos que habitam nos locais mais inóspitos do planeta. Na Tabela 1, destaca-se um conjunto alargado de produtos microbianos com diferentes origens e modos de acção.

Os antibióticos, inicialmente utilizados como agentes antibacterianos e/ou anti-fúngicos, representam o grupo com maior relevância terapêutica e uso clínico (quimioterapia). Na verdade, um grande número de moléculas usadas na quimioterapia convencional resultou de processos de síntese química, tendo como modelo de base moléculas biológicas de origem bacteriana, em particular da classe dos antibióticos. A sua potente acção citotóxica, não dirigida e por isso

Tabela 1 – Produtos de origem microbiana usados como agentes anticancerígenos.

Produto	Origem	Modo de acção
Toxinas Enterotoxina Toxina Diftérica Toxina Shiga Neurotoxina Botulínica Exotoxina A Listeriolisina S	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Terapia citotóxica (Imunotoxinas)
Enzimas Arginina desaminase Glutaminase L-asparaginase Citosina desaminase	<i>Mycoplasma arginini</i> Várias origens Várias origens <i>Escherichia coli</i>	Degradação enzimática de aa essenciais (arginina, ác. glutâmico, ác. aspártico) Conversão do Pró-fármaco em droga (5-FC-5FU)
Outras proteínas e peptidos Azurina e Laz p28 Plantaricina Microcina Pep27 Romidepsina	<i>P. aeruginosa/Neisseria</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Chromobacterium violaceum</i>	Multivalente Multivalente Permeabilização membranas Inibidor da DNA girase Indutor de apoptosis Inibidor de Histona-desacetilases
Antibióticos Actinomicina Mitramicina Doxorrubicina Bleomicina Mitomicina Rizoxina Estaurosporina Borrelidina	<i>Streptomyces sp</i> <i>Streptomyces plicatus</i> <i>Streptomyces peucetius</i> <i>Streptomyces verticillus</i> <i>Streptomyces caespitosus</i> <i>Burkholderia rhizoxinica</i> <i>Streptomyces staurosporeus</i> <i>Streptomyces parvulus</i>	Inibidor da síntese de RNA Inibidor da síntese de RNA Inibidor da replicação do DNA Inibidor da replicação do DNA Inibidor da replicação do DNA Inibição da polimerização da Tubulina Inibidor de cinases Inibidor da treonina-tRNA sintetase
Outros produtos Epotilonas Inib.Farnesiltransferase Salinosporamida Belactosina Siringolina A Rapamicina	<i>Sorangium cellulosum</i> <i>Streptomyces parvulus</i> <i>Salinispora trópica</i> <i>Streptomyces sp</i> <i>Pseudomonas syringae</i> <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Polimerização de microtúbulos Inibição da proteína oncogénica Ras Inibição do Proteossoma Inibição do Proteossoma Inibição do Proteossoma Inibidor da via mTOR

actuando quer no tecido tumoral quer no tecido normal, centra-se ao nível da inibição da síntese de DNA/RNA/proteínas. Várias estratégias têm vindo a ser propostas no sentido de direccionar a sua acção para o tecido tumoral, nomeadamente recorrendo à sua encapsulação em novas formulações de lipossomas (à escala micro ou nano), os quais contêm na sua superfície determinadas moléculas (p.ex. anticorpos, açúcares ou péptidos) preferencialmente reconhecidas pelas células neoplásicas.

De entre os vários produtos bacterianos descritos na tabela 1, e para além dos antibióticos, destacam-se ainda as toxinas bacterianas e outras proteínas/péptidos (Tabela 1). O uso de toxinas de elevada citotoxicidade, produzidas por bactérias patogénicas, permitiu desenvolver uma nova e promissora modalidade terapêutica. Assim, por recurso a técnicas de Engenharia Genética foi possível construir genes recombinantes, compostos pelas sequências de DNA que codificam para várias toxinas, em fase com a sequência codificante

para um determinado domínio de anticorpo, específico para antígenos expostos nas células neoplásicas. A expressão destes genes permite a síntese e purificação de proteínas de fusão (anticorpo-toxina) usada na terapia anti-tumoral (imunotoxinas). Esta estratégia confere especificidade de acção à proteína citotóxica recombinante dado que a presença do domínio de anticorpo permite o seu reconhecimento pelas células tumorais seguido da sua internalização e acção citotóxica intracelular [7].

Na classe das proteínas e péptidos destaca-se como uma nova e promissora abordagem terapêutica o uso da azurina, uma proteína redox da família das cupredoxinas, sintetizada pela bactéria patogénica *Pseudomonas aeruginosa*. Após a sua entrada preferencial nas células neoplásicas, a azurina interacciona com o factor de transcrição p53, estabilizando-o e induzindo apoptose dependente da via das caspases [8]. A azurina inibe ainda o processo de angiogénese [9]. Verificou-se a acção *in vivo* desta proteína, demonstrando-se regressão

tumoral em ratinhos atímicos (*nude*), sem sintomas de toxicidade detectáveis [10]. Destaca-se ainda a existência de uma azurina modificada (Laz) sintetizada por bactérias do género *Neisseria*, a qual é capaz de induzir a regressão de tumores cerebrais, como os glioblastomas [11]. Um péptido com 28 aminoácidos (p28) derivado da azurina de *P. aeruginosa*, foi identificado como responsável pela especificidade da entrada/citotoxicidade da azurina em células neoplásicas. Nos Estados Unidos da América, a empresa CDG Therapeutics Inc., promoveu a realização de ensaios clínicos (fase I) do péptido p28 como agente terapêutico com acção anti-tumoral [12].

Contrariando o paradigma estabelecido no que se refere à pesquisa de drogas anti-cancerígenas (um alvo-uma droga), a proteína azurina parece mostrar uma acção multivalente sobre as células neoplásicas, nomeadamente com a sua acção a ser dirigida a múltiplos alvos extra (caderinas e efrinas) e intracelulares (interacção/estabilização do p53). Esta particularidade parece estar directamente relacionada com as características únicas que a proteína apresenta, nomeadamente pelo facto de ser estruturalmente idêntica aos domínios variáveis das imunoglobulinas, particularmente com os designados anticorpos de cadeia única. A azurina (14 kDa) apresenta uma estrutura rígida de folhas beta (em forma de barril) dispostas em 2 planos e interligados por 4 regiões expostas e flexíveis de dimensão variável (*loops*). Apresenta ainda uma hélice longa exposta, de natureza anfipática (p28). Acresce a estes elementos estruturais o facto da azurina possuir de forma singular, uma extensa região hidrofóbica exposta na sua superfície, a qual delimita a região de ligação do íão cobre.

No âmbito de um projecto de investigação da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), o nosso grupo de investigação no IST/IBB, em conjunto com o grupo de Genética do Cancro do Instituto de Patologia e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP) tem vindo a desenvolver um trabalho que visa avaliar a acção da azurina em linhas celulares de tumores de mama de mau prognóstico, os quais sobreexpressam um tipo particular de Caderina, a Caderina-P [13]. Constatou-se que células tratadas com azurina diminuem de forma significativa os níveis expostos na superfície celular da proteína Caderina-P, bem como das suas formas solúveis, sem no entanto alterarem os níveis da Caderina-E (factor de supressão da invasão). Associado a esta alteração demonstrou-se que o tratamento com a proteína bacteriana diminuía de forma significativa o poder invasivo das células tumorais. Por último, verificaram-se alterações moleculares provocadas pela azurina e de alguma forma justificativas da acção anti-tumoral, nomeadamente a diminuição de formas fosforiladas (activas) do complexo FAK/Src, uma via de sinalização importante para a invasão tumoral activada pela Caderina-P [13]. Por forma a complementar a informação relativa ao modo de actuação da azurina como agente anti-tumoral, procedeu-se à análise do transcriptoma de células tumorais tratadas com esta proteína bacteriana. De um número significativo de genes com expressão alterada, destacam-se os associados à formação de endossomas e a indução da apoptose (sobre-expressos) e os relacionados com receptores membranares importantes para a tumorigenese, bem como para a migração celular (sub-expressos) (Bernardes *et al.*,

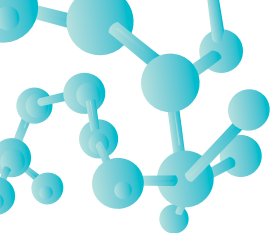
submetido a publicação 2013). No geral, os resultados obtidos são promissores e parecem indicar que a azurina pode vir a constituir-se como uma proteína terapêutica com acção anti-tumoral para cancros de mama com sobre-expressão da Caderina-P.

Conclusões

O mundo microbiano não deixa de nos surpreender! Associada à extrema diversidade taxonómica, fisiológica e molecular, os microrganismos presentes nos mais variados e recônditos habitats parecem ser uma fonte inesgotável para produzir um elevado número de moléculas únicas, capazes de encontrar inúmeras aplicações na indústria e na medicina. Depois da descoberta dos antibióticos, parece agora possível estender o uso dos microrganismos e produtos seus derivados a novas e promissoras formas de terapia anticancerígena. A Biotecnologia tem uma palavra a dizer!!

Referências

- [1] Fialho A.M., Chakrabarty A.M. "Emerging Cancer Therapy: Microbial Approaches and Biotechnological tools" John Wiley & Sons, Inc, p. 432, 2010
- [2] Bernardes N., Chakrabarty A.M., Fialho A.M. "Engineering of bacterial strains and their products for cancer therapy" *Appl Microbiol Biotechnol* 97(12):5189-99, 2013
- [3] Gontero P, Bohle A, Malmstrom PU, O'Donnell MA, Oderda M, Sylvester R, Witjes F. "The role of *Bacillus Calmette-Guérin* in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer" *Eur Urol.* 57:410-429, 2010
- [4] Morrissey D., O'Sullivan G.C. Tangney M. "Tumour targeting with systemically administrated bacteria" *Curr Gene Ther* 10:3-14, 2010
- [5] Dang L.H., Bettegowda C., Huso D.L., Kinzler K.W., Vogelstein B. "Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors" *PNAS* 98:15155-15160, 2001
- [6] Cronin M., Akin A.R., Collins S. a, Meganck J., Kim J.-B., Baban C.K., Joyce S. a, Van Dam G.M., Zhang N., Van Sinderen D., O'Sullivan G.C., Kasahara N., Gahan C.G., Francis K.P., Tangney M. "High resolution in vivo bioluminescent imaging for the study of bacterial tumour targeting" *PLoS One* 7:e30940, 2012
- [7] Weldon J.E., Pastan I. "A guide to taming a toxin--recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cancer" *FEBS J* 278:4683-4700, 2011
- [8] Yamada T., Goto M., Punj V., Zaborina O., Chen M.L., Kimbara K., Majumdar D., Cunningham E., Das Gupta T.K., Chakrabarty A.M. "Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer" *PNAS* 99:14098-103, 2002
- [9] Mehta R.R., Yamada T., Taylor B.N., Christov K., King M.L., Majumdar D., Lekmine F., Tirupathi C., Shilkaitis A., Bratescu L., Green A., Beattie C.W., Das Gupta T.K. "A cell penetrating peptide derived from azurin inhibits angiogenesis and tumor growth by inhibiting phosphorylation of VEGFR-2, FAK and Akt" *Angiogenesis* 14(3):355-369, 2011
- [10] Punj V., Bhattacharyya S., Saint-dic D., Vasu C., Cunningham E.A., Graves J. "Bacterial cupredoxin azurin as an inducer of apoptosis and regression in human breast cancer" *Oncogene* 23:2367-2378, 2004
- [11] Hong C.S., Yamada T., Hashimoto W., Fialho A.M., Das Gupta T.K., Chakrabarty A.M. "Disrupting the entry barrier and attacking brain tumors: the role of the *Neisseria* H.8 epitope and the Laz protein" *Cell Cycle* 5(15):1633-1641, 2006
- [12] Warso M.A., Richards J.M., Mehta D., Christov K., Schaeffer C., Rae Bresler L., Yamada T., Majumdar D., Kennedy S.A., Beattie C.W., Das Gupta T.K. "A first-in-class, first-in-human, phase I trial of p28, a non-HDM2-mediated peptide inhibitor of p53 ubiquitination in patients with advanced solid tumours" *Br J Cancer* 19:108(5):1061-1070, 2013
- [13] Bernardes N., Ribeiro A.S., Abreu S., Mota B., Matos R.G., Arraiano C.M., Seruca R., Paredes J., Fialho A.M. "The bacterial protein azurin impairs invasion and FAK/Src signaling in P-cadherin-overexpressing breast cancer cell models" *PLoS One*.19;8(7):e69023, 2013



Utilização de *Drosophila* como modelo animal para a identificação de biomarcadores e de compostos com atividade biológica

Joana O. Branco e Nuno A. Faustino

Gene PreDiT – Biocant Park, Parque Tecnológico de Cantanhede - 3060-197 Cantanhede

E-mail: andre.faustino@genepredit.com.pt

Sem nos apercebermos, a verdade é que a grande maioria das atividades que realizamos ao longo do dia tem algum componente efetuado com a ajuda da biotecnologia. Apesar da área com um leque mais alargado de soluções biotecnológicas ser a área da saúde, a verdade é que existem inúmeras aplicações onde a biotecnologia tem uma palavra a dizer.

Os alimentos geneticamente modificados (GMOs), que tanta polémica continuam a gerar, hoje em dia já ocupam cerca de 10% da terra cultivada no nosso planeta e mais de 13 milhões de agricultores no mundo inteiro utilizam produtos de base biotecnológica. Estes alimentos possuem geralmente um ou mais genes alterados que melhoram a sua produtividade, aumentam a sua resistência a pragas ou a um determinado herbicida, melhoram as suas características nutricionais ou o rendimento do seu processamento. Um dos últimos avanços tecnológicos trata-se de uma macieira em que o gene que codifica para a polifenol oxidase foi silenciado. Esta alteração faz com que o processo oxidativo da maçã (que as torna castanhas após o corte) seja muito mais lento, aumentando a vida útil dos produtos laminados.

No sector têxtil, a maioria dos detergentes existentes contêm proteases selecionadas de acordo com determinadas características (como resistência a elevadas temperaturas, elevada atividade proteolítica a baixas temperaturas, resistência a diferentes condições de sais, ...).

No sector industrial, a biotecnologia tem desenvolvido inúmeras soluções para melhorar processos tão diversos como a produção de papel, a limpeza de resíduos tóxicos ou a produção de polímeros mais resistentes e leves.

E estes são apenas alguns exemplos. A biotecnologia é transversal, e está presente nas mais diversas áreas.

No entanto, e tal como foi já referido, é no sector da saúde que o impacto da biotecnologia tem tido o seu maior impacto.

Fruto do investimento nesta área, várias doenças são hoje tratadas com recurso a medicamentos desenvolvidos pela biotecnologia, incidindo essencialmente nas doenças raras, doenças do foro oncológico, doenças infecciosas ou autoimunes.

De acordo com os dados disponíveis no site da EuropaBio (<http://www.europabio.org/>), em 2007 mais de 325 milhões de doentes beneficiavam de medicamentos com base na

biotecnologia. Estima-se ainda que cerca de 50% de todos os novos medicamentos têm origem num processo biotecnológico, sendo que esta proporção é ainda aumentada se considerarmos os tratamentos com fatores de crescimento recombinantes, vacinas, anticorpos monoclonais e as terapias celulares. Este é por isso um sector com uma taxa de crescimento muito superior ao sector farmacêutico focado nos métodos tradicionais.

Um dos grandes marcos da biotecnologia médica foi a aprovação em 1998 da utilização de Trastuzumab, vulgarmente conhecido por Herceptin, para o tratamento de cancro de mama em pacientes positivos para a proteína Her2. O Herceptin apenas é útil para doentes em que a produção da proteína Her2 esteja elevada, pelo que é o primeiro medicamento desenvolvido de acordo com a presença de um biomarcador genético nos pacientes. Foi o nascimento da medicina personalizada, uma realidade prometida mas ainda não concretizada.

A medicina personalizada visa permitir desenvolver medicamentos específicos para cada caso ou, pelo menos, tornar os grupos em tratamento mais homogéneos, fazendo com que o tratamento seja mais eficaz e com menos efeitos secundários. Estima-se que apenas 40% dos medicamentos produzam efeitos benéficos significativos aos pacientes que os tomam. O que implica que 60% dos medicamentos tomados não deveriam ser prescritos pois ou não produzem benefícios significativos ou os efeitos secundários superam os efeitos benéficos da medicação. Grande parte deste problema deve-se à dificuldade em distinguir diferentes patologias ou mesmo diferentes subgrupos de cada patologia. Este é um aspeto particularmente significativo em doenças graves, como os diferentes tipos de cancro, ou doenças crónicas, como é o caso das doenças psiquiátricas e neurológicas. Assim, é essencial desenvolver novas metodologias para identificar biomarcadores (genéticos, metabólicos, ...) que permitam distinguir melhor os pacientes de acordo com as suas características e assim desenvolver terapias dirigidas.

Hoje em dia, 13 anos depois da sequenciação do primeiro genoma Humano, a sequenciação de um genoma custa menos de 10 mil dólares, cerca de 0.01% do que custou a do primeiro genoma Humano. A facilidade com que é possível obter toda esta informação (o nosso genoma contém cerca

de 6.4 mil milhões de nucleótidos) faz com que seja possível perceber quais os genes e os nucleótidos relevantes para cada uma das condições e, mais importante, permite caracterizar e distinguir diferentes subtipos de doenças, levando a que sejam tratadas de modo diferente. No fundo encontrar biomarcadores.

A utilização de biomarcadores na saúde humana tem melhorado o que sabemos sobre uma dada doença e irá permitir um novo conhecimento sobre os mecanismos e processos envolvidos na patologia, permitindo assim uma melhor gestão da saúde através de um diagnóstico mais atempado e do desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras. Com o propósito de explorar o potencial, utilidade e relevância dos biomarcadores, nasce a Gene PreDiT.

A Gene PreDiT tem como objetivo principal identificar novos genes associados a determinadas doenças e à descoberta de alternativas terapêuticas destinadas a essas doenças, através da identificação de compostos (químicos ou naturais) capazes de modular a sua sintomatologia característica. A estratégia base da empresa tira partido da utilização de *Drosophila melanogaster*, vulgarmente conhecida como mosca da fruta, como modelo animal.

Neste sentido, a Gene PreDiT desenvolveu duas plataformas de investigação. A primeira, *Genome Sift*, permite a identificação de novos marcadores genéticos associados a uma doença. Esta plataforma tem por base estudos em larga escala em *Drosophila*, cujos resultados são posteriormente validados em doentes Humanos. Esta análise combinada em moscas e Homem reforça a validade dos dados científicos identificados e reduz os falsos positivos.

A segunda plataforma, *Drug Rescue*, permite o rastrear em *Drosophila* compostos tendo em vista identificar quais conseguem modular os sintomas da doença modelados em *Drosophila*.

Com estas plataformas, a Gene PreDiT pretende afirmar-se simultaneamente no mercado dos biomarcadores, no mercado farmacêutico e nutracêutico.

Nos últimos anos a atividade da empresa tem estado centrada no estudo da Obesidade, uma doença que afeta mais pessoas do que a subnutrição. Esta estratégia permitiu identificar um painel de novos marcadores genéticos associados a um subtipo da doença e um fármaco com atividade dirigida aos indivíduos com um determinado perfil genético. Estes resultados estão neste momento em fase de submissão de patente para serem posteriormente licenciados.

Drosophila como modelo animal

Apesar dos modelos baseados em organismos vertebrados apresentarem vantagens claras no estudo de doenças Humanas, os organismos invertebrados, como *D. melanogaster*, têm contribuído largamente nesta área.

A mosca da fruta tem um dos históricos mais longos em termos de utilização como organismo modelo, tendo sido amplamente utilizada em estudos genéticos, de desenvolvimento e farmacológicos. Existe uma larga coleção de ferramentas



Figura 1 – Frascos de cultura de *Drosophila melanogaster*

moleculares, genéticas e genómicas e dados biológicos sobre *Drosophila*, facilitando a sua utilização como modelo animal. Ao longo do tempo, a *Drosophila* contribuiu para os avanços da investigação biomédica, fornecendo dados e modelos mecanísticos em como a desregulação de uma determinada via metabólica pode desencadear uma determinada doença. O melhor exemplo destes avanços é o Vandetanib, um composto aprovado pela FDA para o tratamento de certos tipos de cancro da tiróide baseado em estudos iniciais em *Drosophila*.

Apesar de 20 vezes inferior em tamanho, o genoma da *Drosophila melanogaster* possui cerca de 67% do número de genes existentes no Genoma Humano. Adicionalmente, cerca de 75% dos genes Humanos associados a uma doença, possuem homólogos em *D. melanogaster*, sendo por isso possível utilizar a *Drosophila* para estudar a função e os relacionamentos desses genes num organismo complexo.

Adicionalmente, a mosca da fruta pode ser mantida em laboratório recorrendo a uma dieta simples, com um custo relativamente baixo. Com um intervalo entre gerações curto, cerca de 2 semanas, os estudos em larga escala e ao longo de várias gerações tornam-se possíveis.

Hoje em dia existem largas dezenas de modelos de doença em *Drosophila* em patologias tão diversas como Alzheimer's, Parkinson, Obesidade, Envelhecimento e Cardiomiopatias.

No entanto, todos os modelos disponíveis apresentam vantagens e desvantagens, pelo que a escolha do modelo animal a utilizar depende especificamente do tipo de doença, do alvo, do tipo de órgãos envolvido e da conservação dos genes envolvidos.

Referências

- www.europabio.org
- www.bio.org/
- "Policy Issues for the Development and Use of Biomarkers in Health", OECD Report, 2011
- Konsolaki M., "Fruitful research: drug target discovery for neurodegenerative diseases in *Drosophila*", Expert Opin Drug Discov. 2013 Oct
- Wiecek Andrew S., "Ninety-Six Wells of Flies on a Plate", Drug Discovery & Development, 2013 Oct

O potencial biotecnológico dos bacteriófagos na detecção e controlo de bactérias patogénicas

Joana Azeredo

IBB- Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

E-mail: jazeredo@deb.uminho.pt

Os bacteriófagos (fagos) apresentam um imenso potencial biotecnológico com aplicação na saúde devido às suas características intrínsecas de reconhecimento e morte do hospedeiro que infetam (bactérias). A exploração destas características no desenvolvimento de métodos de **detecção** e de **controlo** de bactérias patogénicas é relativamente recente, embora a utilização de fagos como ferramentas de biologia molecular seja bastante antiga e a **terapia fágica** uma prática secular, actualmente limitada a alguns países.

Classificação e características estruturais e funcionais dos fagos

A classificação dos fagos segundo o Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*) é baseada na morfologia e no tipo de ácido nucleico que os constituem (ADN ou ARN de cadeia simples ou dupla). Apesar de se ter tentado adequar a classificação dos fagos a métodos mais recentes, baseados no genoma ou no proteoma [1], os critérios morfológicos prevalecem.

A grande maioria dos fagos (cerca de 96%) até agora isolados pertence à ordem *Caudovirales* [2]. Estes fagos são caracterizados por possuírem uma cápside onde se encontra o material genético empacotado, que neste caso é ADN de cadeia dupla, cauda e fibras da cauda. A cápside é a estrutura que protege a informação genética e a cauda possui fibras ou outras estruturas que estão envolvidas no reconhecimento e ligação do fago à bactéria hospedeira.

Os fagos pertencentes à ordem *Caudovirales* são divididos em três famílias: *Myoviridae*, caracterizada por fagos com cauda longa contráctil (ex. fago T4); *Siphoviridae*, onde se incluem fagos com cauda longa não contráctil (ex. fago lambda); e *Podoviridae*, que engloba fagos com cauda curta (ex. fago T7) (Figura 1). No genoma dos fagos encontram-se genes que codificam proteínas responsáveis pelo empacotamento e replicação de DNA, regulação da transcrição, lise do hospedeiro, bem como proteínas estruturais [2].

Interação fago-hospedeiro

A interação fago-hospedeiro é muito específica e o reconhecimento é habitualmente feito por intermédio de proteínas situadas nas extremidades da cauda ou nas fibras da

cauda. Após o reconhecimento (caracterizado por uma ligação reversível) dá-se o posicionamento correto da base da cauda, seguido da ligação irreversível de uma outra proteína do fago a um recetor secundário da bactéria [3]. Os recetores bacterianos mais comuns são lipopolissacarídeos ou proteínas superficiais (porinas ou proteínas de transporte) no caso de bactérias Gram-negativas, enquanto em bactérias Gram-positivas são elementos do peptidoglicano, ácidos teicóicos e lipoteicóicos e proteínas associadas.

A especificidade dos fagos limita a sua interação com um número reduzido de estirpes. Existem contudo fagos com espectros de ação mais alargada que podem abranger diferentes estirpes da mesma espécie ou até diferentes espécies (sendo estes designados por fagos multivalentes). Exemplo disto são os fagos Felix O1 ou o fago PVP-SE1 que infetam um conjunto muito alargado de estirpes de *Salmonella enterica* e conseguem também infetar algumas estirpes de *E. coli*.

Um fago virulento apresenta um ciclo de vida estritamente lítico no qual após ligação irreversível, injeção do ADN e síntese de novas partículas virais, o hospedeiro é lisado a partir do seu interior, para ser possível a libertação de novas partículas virais para o meio extracelular.

O papel das endolisinas na lise de bactérias

Os fagos lisam a célula hospedeira a partir do seu interior, geralmente usando o sistema holina-endolisina (existindo contudo outros mecanismos de lise celular), onde as holinas causam poros na membrana celular, permitindo que as endolisinas tenham acesso ao peptidoglicano, sobre o qual exercem a sua atividade catalítica. A maioria das endolisinas que atua em bactérias Gram-positivas possui uma estrutura modular. Estas endolisinas são compostas por dois tipos de domínios com diferentes funcionalidades: um domínio de ligação no terminal C e um domínio catalítico no terminal N. Normalmente estes dois domínios encontram-se separados por um pequeno espaçador. Dada a presença de um domínio de ligação nas endolisinas de fagos que infectam bactérias Gram-positivas, estas enzimas apresentam, na sua generalidade, um espectro lítico restrito. Esta especificidade permite a sua adição exógena a um hospedeiro sensível, na ausência de fago, provocando a sua lise num processo denominado por "lise a partir do exterior". As endolisinas de fagos que atuam em bactérias Gram-negativas apresentam

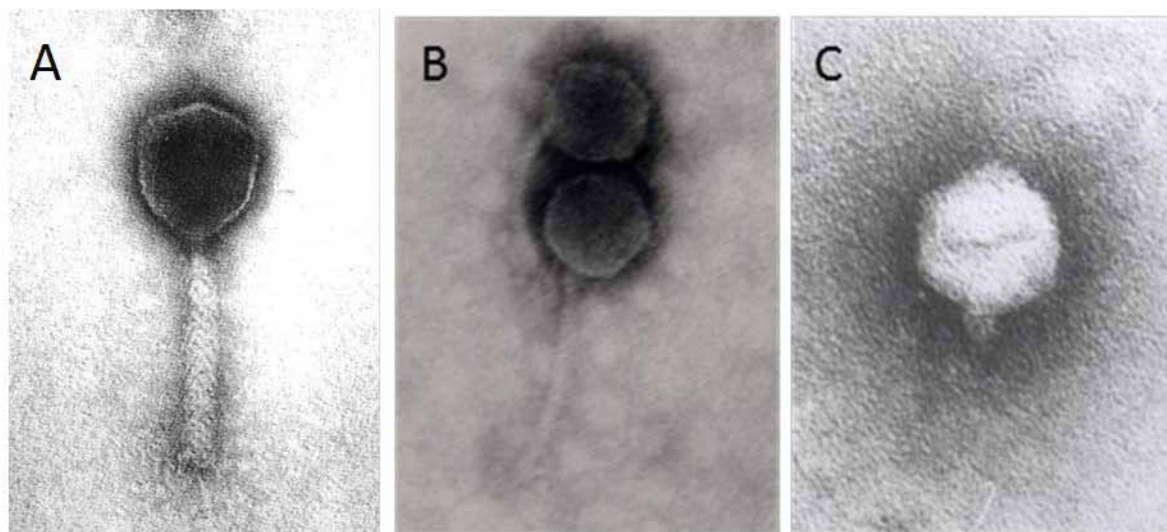


Figura 1 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de fagos com cauda; a) Fago *Myoviridae* tipo-rV5 de *Salmonella enterica* Enteritidis; b) Fago *Siphoviridae* tipo-Jersey de *Salmonella enterica* Enteritidis; c) Fago *Podoviridae* tipo-T7 de *Pseudomonas fluorescens* (fagos pertencentes à coleção de bacteriófagos do Centro de Engenharia Biológica)

na sua maioria uma estrutura globular, apenas com um domínio catalítico, e portanto têm um espectro de ação mais alargado. Contudo foram recentemente descritas endolisinas de Gram-negativas modulares, constituídas por um domínio de ligação e domínio catalítico [4].

Terapia fágica

Presentemente, a terapia fágica é baseada no uso de fagos líticos para o tratamento de infeções bacterianas, nomeadamente as resistentes a antibióticos. A maioria dos testes clínicos relacionados com o uso de fagos tem sido principalmente desenvolvida em países da Europa de Leste como a Polónia, Geórgia e Rússia. Os resultados destes estudos têm-se revelado encorajadores uma vez que os fagos têm apresentado grande eficácia para um largo espectro de infeções [5].

O crescente e actual interesse dos fagos como agentes terapêuticos contra doenças infecciosas deve-se fundamentalmente ao aparecimento de bactérias com múltiplas resistências aos antibióticos. Os fagos apresentam a capacidade de lisar os hospedeiros (bactérias) utilizando mecanismos de controlo bacteriano diferente dos antibióticos e por isso são capazes de matar bactérias resistentes a antibióticos. Para além disso, apresentam características únicas que incentivam a sua utilização como alternativa ou complemento aos antibióticos. A ubiquidade no ambiente, facilidade de isolamento, elevada especificidade (não interferindo com a flora natural do paciente), ausência de toxicidade e baixo custo de produção são algumas das características que tornam a terapia fágica apelativa. Adicionalmente, os fagos promovem evoluções adaptativas através da dinâmica de interações com os seus hospedeiros pelo que o problema de resistência poderá ser facilmente ultrapassado [6].

Não obstante as evidências clínicas da eficácia dos bacteriófagos no controlo de infeções, os produtos à base de fagos encontram barreiras regulatórias que dificultam a sua transferência para o mercado [7]. O setor farmacêutico, a nível mundial, tem-se mantido resistente à mudança. Continua a

observar-se a tendência para o aumento dos custos de desenvolvimento de biofármacos, juntamente com o consequente declínio da taxa de aparecimento de novos produtos aprovados. Esta situação é reforçada pelos obstáculos regulatórios impostos pela União Europeia na validação de terapias não tradicionais como é o caso da terapia fágica. Existe uma clara consciência global por parte da comunidade científica, e não só, de que é urgente repensar os mecanismos reguladores para se conseguir dar uma segunda oportunidade à terapia fágica no mundo ocidental e em particular nos países da União Europeia.

Utilização de fagos na deteção e controlo de patogénicos: Exemplo do PVP-SE1

O fago PVP-SE1 é um fago pertencente à família *Myoviridae* (tipo -rV5) (Figura 1A). Este fago apresenta um espectro de ação muito alargado (multivalente) sendo capaz de infetar todos os serotipos de *Salmonella enterica* [8], pelo que se torna uma ferramenta robusta de deteção de *Salmonella*, em oposição aos anticorpos que apresentam elevada especificidade e baixa estabilidade para além do custo associado à sua produção ser elevado. Com efeito, a capacidade de reconhecimento dos fagos é uma das características exploradas no desenvolvimento de métodos de deteção de patogénicos, alguns deles baseados na utilização de sensores magnéticos. Os primeiros trabalhos neste domínio utilizaram fagos filamentosos, contudo o espectro de ação destes fagos é reduzido (são muito específicos, reconhecendo uma gama pequena de estirpes) o que torna limitada a aplicação desta tecnologia [9]. A utilização de fagos com espectro de ação mais alargada poderia obviar esta limitação. O fago PVP-SE1 é um excelente candidato, contudo é um fago virulento que lisa as células que reconhece, pelo que a sua utilização como bioelemento em biossensores pode ser comprometida [8]. Uma outra limitação deste fago é a sua morfologia. Neste tipo de fagos, para que haja reconhecimento, as fibras da cauda têm que estar expostas; pelo que o processo de imobilização terá que permitir que essas fibras não fiquem ocultadas. Recente-

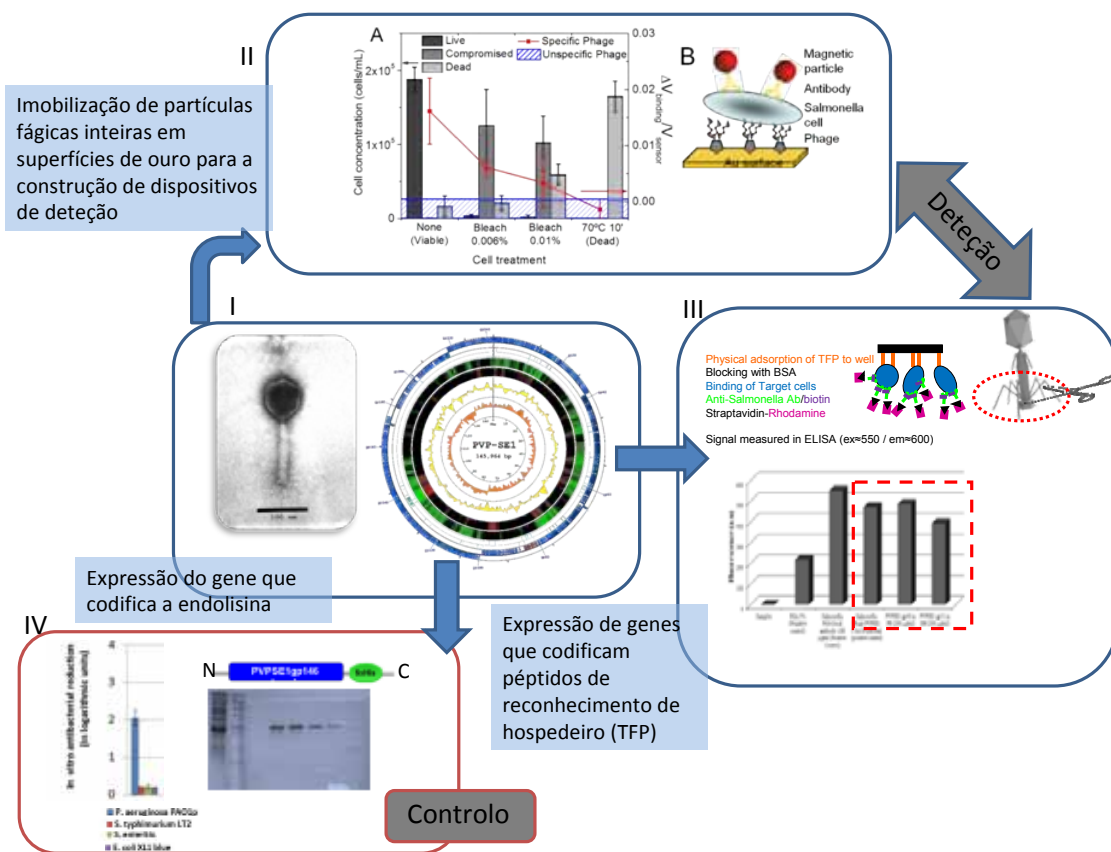


Figura 2 – Utilização de fagos no **controle** e **detecção** de patogênicos – *Case study* fago PVP-SE1: I) Imagem TEM do fago PVP-SE1 pertencente à família Myoviridae e genoma anotado do fago com 145964 bp. II) Detecção de *Salmonella enterica* Enteritidis num biosensor MR utilizando fagos inteiros: A) Voltagem normalizada (obtida no sensor MR) de amostras de *Salmonella enterica* Enteritidis submetidas a diferentes tratamentos com hipoclorito e apresentando diferentes formas de viabilidade (a viabilidade celular foi determinada por citometria de fluxo); B) Representação esquemática do reconhecimento biomolecular utilizando uma estratégia do tipo "sandwich", no qual o fago captura a bactéria através das fibras da cauda III) Representação esquemática do método utilizado para a detecção de *Salmonella enterica* Enteritidis utilizando um leitor de microplacas e uma estratégia ELISA, no qual são utilizadas as fibras da cauda – TFP (gp40 e gp 51) expressas em *E. coli* e imobilizadas no fundo do poço da placa. A intensidade do sinal gerado quando são utilizadas as TFP é equivalente à intensidade do sinal quando é utilizado o fago inteiro ou um anticorpo contra *Salmonella enterica* Enteritidis. IV) Resultados da atividade da endolisina do fago PVP-SE1 expressa em *E. coli* e que apresenta um peso molecular aproximado de 25 kDa.

mente o grupo de Biotecnologia de Bacteriófagos do Centro de Engenharia Biológica em colaboração com o Laboratório Ibérico de Nanotecnologia, desenvolveu uma interface de detecção de *Salmonella* utilizando o fago PVP-SE1 num biosensor magnetoresistivo (MR). O método de imobilização, assim como as condições de reconhecimento, foram otimizados de forma a que o fago tenha uma elevada eficiência de detecção sem actividade lítica. Os resultados apresentados na Figura 2.II mostram a capacidade do fago PVP-SE1 em reconhecer células viáveis não cultiváveis obtidas após tratamento com várias concentrações de hipoclorito. A intensidade do sinal de interação do fago com a bactéria é proporcional à quantidade de células viáveis. Estes resultados permitiram por um lado provar que fagos virulentos são excelentes bioelementos no reconhecimento de bactérias e por outro lado que os fagos têm a capacidade de discriminar estados de viabilidade, o que constitui uma outra mais-valia dos fagos em relação aos anticorpos na detecção de patogênicos [10].

A análise do genoma do fago PVP-SE1 (Figura 2.I) permitiu a identificação dos genes que expressam as proteínas das fibras das caudas que contêm os péptidos envolvidos no reconhecimento do hospedeiro. A caracterização funcional dos genes foi feita seguindo uma estratégia ELISA na qual gp40 e gp51 expressos heterologicamente foram imobilizados na superfície

de poços de microplacas de poliestireno (Figura 2.III). Os resultados obtidos demonstraram que gp40 e gp51 têm capacidade de se ligar a *Salmonella enterica* Enteritidis e que o sinal gerado é semelhante ao sinal gerado quando são utilizados anticorpos específicos. Por conseguinte, as proteínas fágicas envolvidas no reconhecimento dos hospedeiros podem igualmente ser utilizadas na detecção de patogênicos [11].

O fago PVP-SE1, tal como todos os fagos virulentos da família Myoviridae, codifica um mecanismo de lise do hospedeiro baseado num sistema holina-endolisina. A endolisina deste fago, ao contrário da generalidade das endolisinas de fagos que atuam em bactérias Gram-negativas, tem uma estrutura modular [12]. Com efeito, a endolisina PVP-SE1gp146 apresenta no terminal N um domínio de ligação à parede celular e no terminal C um domínio catalítico. As endolisinas, como foi referido acima, hidrolisam o peptidoglicano e por isso têm uma aplicação óbvia e direta no controlo de bactérias Gram-positivas. Já existe um conjunto alargado de endolisinas para o controlo de várias espécies de bactérias Gram-negativas [13]. Nestas bactérias o fenómeno de "lise a partir do exterior" por endolisinas é impedido pela membrana externa pelo que o estudo destas enzimas em bactérias Gram-negativas é limitado. Contudo a associação de endolisinas com permeabilizantes de membrana celular permite

uma eficiente lise celular. No caso particular da Lys-PVP-SE1gp146 consegue-se obter 2 ciclos de redução logarítmica de *P. aeruginosa* após 10 minutos de ação da endolisina em associação com EDTA.

Conclusões e Perspetivas Futuras

Os fagos, em consequência das suas propriedades, constituem uma alternativa promissora à antibióterapia. A terapia fágica praticada nalguns países tem revelado resultados auspiciosos e a necessidade de se desenvolver mecanismos eficientes de controlo de doenças infecciosas resistentes a antibióticos tem impulsionado e estimulado a investigação dos fagos como agentes antibacterianos. Existem no entanto preocupações ao nível da segurança dos fagos que têm sido aproveitadas pelas entidades reguladoras para protelar a regulamentação desta prática terapêutica. As preocupações assentam no rápido desenvolvimento de resistência aos fagos por parte das bactérias (por exemplo *P. aeruginosa* desenvolve fenótipos resistentes após 24h de interação com fagos [14]) e na possibilidade do genoma dos fagos codificar toxinas. Embora as sequências genéticas dos fagos atualmente usados em terapia sejam conhecidas, a verdade é que se desconhece a função de mais de 30% dos genes presentes em cada genoma. Acredita-se que a terapia fágica é segura e os defensores dessa prática justificam essa segurança pela ubiquidade dos fagos no organismo humano saudável. Foi recentemente publicado um artigo na *Nature News* que refere que a mucosa humana está colonizada por fagos que a protegem contra a invasão bacteriana [15].

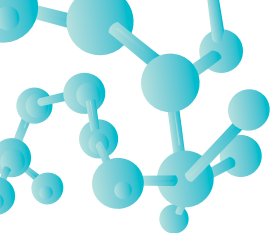
Enquanto se assiste à “discussão” entre os defensores e opositores da terapia fágica e à inércia das entidades reguladoras, a comunidade científica tem procurado nos fagos outras soluções alternativas para o controlo de infeções. São exemplo disso a expressão heteróloga de endolisinas quiméricas com actividade catalítica melhorada, maior estabilidade e capazes de atuar em bactérias Gram-negativas sem ação de agentes permeabilizantes e também o desenvolvimento de fagos quiméricos que expressem múltiplos péptidos de reconhecimento, evitando assim o rápido desenvolvimento de resistências, e cujo genoma contenha apenas proteínas estruturais e essenciais para a replicação do fago e lise do hospedeiro. Paralelamente, o potencial de reconhecimento dos fagos é imenso e a sua utilização nas mais variadas plataformas de deteção de patogénicos já validadas com a utilização de anticorpos, enzimas ou ADN como bioelementos apresenta um excelente potencial tecnológico. Dada a elevada especificidade dos fagos, todas estas aplicações visam o desenvolvimento de soluções de diagnóstico e terapêuticas dirigidas ao agente patogénico que causa infecção e por isso preconizam terapias personalizadas. Estima-se que existam 10^{31} [16] partículas fágicas no planeta o que faz dos fagos as entidades mais abundantes na Natureza, constituindo por isso uma fonte inesgotável de material biológico que pode ser explorada para o desenvolvimento de produtos com aplicação na saúde e em particular na prestação de cuidados de saúde personalizados, um dos desafios sociais preconizados na agenda do Horizonte 2020.

Agradecimentos

Este artigo apresenta trabalho científico desenvolvido nos últimos dois anos pelo Grupo de Biotecnologia de Bacteriófagos (BBiG; www.ceb.uminho.pt/bbig/) do Centro de Engenharia Biológica em colaboração com o Laboratório Ibérico de Nanotecnologia (INL) e a Universidade Católica de Leuven (KUL). Agradeço ao Prof. Paulo Freitas e à Dra. Verónica Romão do INL que tiveram um papel determinante na construção das ferramentas de deteção e ao Dr. Rob Lavigne da KUL que apoiou os estudos relacionados com as endolisinas. Por fim, agradeço à minha equipa, constituída por excelentes investigadores extremamente motivados e criativos a quem devo o reconhecimento internacional que o grupo tem atualmente.

Referências

- [1] Rohwer, F., Edwards, R. (2002) The Phage Proteomic Tree: a Genome-Based Taxonomy for Phage. *J Bacteriology*. 184, 4529-4535.
- [2] H.-W. Ackermann, (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope., *Archives of virology*. 152 (2), 227-243.
- [3] Leiman, P.G., Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V.V., Arisaka, F., Rossmann, M.G. (2003) Structure and morphogenesis of bacteriophage T4, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 60(11), 2356-2370.
- [4] Oliveira, H., Melo, L.D.R., Santos, S.B., Nóbrega, F.L., Ferreira, E.C., Cerca, N., Azeredo, J., Kluskens, L.D. (2013) Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins. *Journal of Virology*, 87(8), 4558-70.
- [5] Abedon, S., Kuhl, S., Blasdel, B., Kutter, E. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 1, 66-85.
- [6] Kropinski, A. (2006). Phage therapy – everything old is new again. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 17, 297-306.
- [7] Pirnay, J.-P., De Vos, D., Verbeken, G., Merabishvili, M., Chanishvili, N., Vaneechoutte, M., Zizi, M., Laire, G., Lavigne, R., Huys, I., Van den Mooter, G., Buckling, A., Debarbieux, L., Pouillot, F., Azeredo, J., Kutter, E., Dublanche, A., Górski, A., Adamia, R. (2011) The phage therapy paradigm: prêt-à-porter or sur-mesure? *Pharmaceutical Research*. 28(4), 937-937.
- [8] Santos, S., Kropinski, A.M., Ceyssens, P.-J., Ackermann, H.W., Villegas, A., Carvalho, C.M., Lavigne, R., Krylov, V.N., Ferreira, E.C., Azeredo, J. (2011) Genomic and proteomic characterization of the broad host range *Salmonella* phage PVP-SE1 - The creation of a new phage genus. *Journal of Virology*, 85(21), 11265-11273.
- [9] Singh, A., Somayeh, P., Evoy, S. (2013) Recent Advances in Bacteriophage Based Biosensors for Food-Borne Pathogen Detection. *Sensors (Basel)*, 13(2), 1763-1786.
- [10] Fernandes, E., Martins V.C. Nóbrega, C., Carvalho, C.M., Cardoso, F.A., Cardoso, S., Dias, J., Deng, D., Kluskens, L.K., Freitas, P.P., Azeredo, J. (2014) A bacteriophage detection tool for viability assessment of *Salmonella* cells, *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 239-246, 2014.
- [11] Azeredo, J., Fernandes, E., Santos, S., Kluskens, L., Silva, S., Lavigne, R., Cornelissen, A., Vandersteegen, L. “Peptides and derivatives thereof for detection and control of *Salmonella*.” WO 2013/02442159545, 2013
- [12] Walmagh, M., Briers, Y., Santos, S. B., Azeredo, J., Lavigne, R. (2012) Characterization of Modular Bacteriophage Endolysins from Myoviridae Phages OBp, 201φ2-1 and PVP-SE1. *PlosOne*, 7, 1-10.
- [13] Cheng, Q., Nelson, D., Zhu, S., & Fischetti, V. A. (2005). Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 111-117.
- [14] Pires, D.P., Silva, S., Almeida, C., Henriques, M., Andeson, E.M., Lam, J.S., Silankorva, S., Azeredo, J. (2013) Evaluation of the ability of *C. albicans* to form biofilm in the presence of phage-resistant phenotypes of *P. aeruginosa*, *Biofouling*, 29 (10), 1169-1180.
- [15] Ed Yong. (2013) Viruses in the gut protect from infection Phages in mucus aid immune system by killing invading bacteria. *Nature News*, 20 May, 2013.
- [16] Wommack, K.E., Colwell, R.R. (2000) Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 69-114.



Sistemas preditivos nas neuropatologias com base nas interações proteína:proteína

Odete A. B. da Cruz e Silva

Laboratório de Neurociências, Centro de Biologia Celular, Secção Autónoma de Ciências da Saúde, Universidade de Aveiro, Portugal

E-mail: odetecs@ua.pt

Resumo

A identificação de redes complexas de interação proteína:proteína ajuda definir a sequência de eventos fisiologicamente relevantes e pontos moleculares de convergência, que oferecem potenciais alvos diagnósticos e terapêuticos. Este artigo apresenta algumas das metodologias utilizadas para identificar as redes biológicas e as potenciais proteínas chave que representam uma mais valia para a biotecnologia vermelha.

Introdução

A biotecnologia vermelha, entre outros tópicos, aborda a descoberta de novos diagnósticos e de novas terapias e tratamentos, associando-se assim à indústria farmacêutica. Claramente é importante entender as patologias a partir da sua base molecular, em particular os processos fisiológicos que decorrem dentro das células e no que diz respeito à comunicação extracelular e célula-célula, de modo a produzir respostas altamente coordenadas. Por associação, as anomalias associadas a estes processos moleculares vão contribuir para várias patologias. Plataformas estão a ser desenvolvidas no que diz respeito a integrar redes de proteínas, genes e metabolitos. Várias contribuições científicas têm vindo a descrever redes complexas de proteínas que interagem, conseguindo desvendar cascatas e redes de sinalização, e redes relevantes regulatórias e metabólicas para os sistemas biológicos. Termos novos dominam as redes que se descrevem, por exemplo transcriptoma, interactoma, proteoma, metaboloma e secretoma.

O conjunto de proteínas que interage com uma única proteína é o seu interactoma. Podemos ainda construir interactomas sucessivamente, resultando em complexas redes proteicas. Estas metodologias contribuem para a identificação de novos biomarcadores. Biomarcadores têm que ser sensíveis e específicos, podendo também ter uma característica adicional e que se associe ao estado patológico, como a concentração 'in situ' ou o nível de fosforilação. Os biomarcadores moleculares são tipicamente de origem genética ou proteica e a sua aplicação passa por técnicas de biologia molecular, imunohistoquímica ou ainda microarrays. Um bom alvo pode ser um marcador que irá permitir o diagnóstico numa fase precoce e/ou monitorizar o sucesso da terapia, ou um candidato alvo para o qual se pode desenvolver uma nova terapia.

Biologia de sistemas e redes biológicas nas neuropatologias

A biologia de sistemas está na fronteira com a investigação biomédica e permite analisar o imenso volume de dados que

estamos a acumular com as experiências de larga escala. Adicionalmente estão a ser incrementados algoritmos para a simulação de redes complexas aplicadas aos mecanismos moleculares, em situações celulares basais e em processos que emergem na doença. Nas redes que resultam identificou-se que os módulos funcionais coincidem com os módulos estruturais (Hartwell et al, 1999; Wang et al 2007). Os módulos funcionais correspondem a um processo biológico celular e os módulos estruturais, na rede, correspondem a conjuntos de nós altamente conectados entre si mas pouco conectados com outros nós na rede. Os nós altamente conectados têm a designação de 'hubs'.

Um estudo interessante focou nas patologias humanas em si, descrevendo o 'diseasome' e identificou também um conjunto de genes, que mereceram a designação 'disease genome' (Goh et al 2007). O trabalho desenvolvido é consistente com a existência de módulos funcionais específicos a condições patológicas. Os investigadores descreveram que genes essenciais tipicamente codificam proteínas 'hub' e que são expressas em muitos tecidos. Por contraste os genes associados às várias patologias não são essenciais e tendencialmente não codificam proteínas 'hub'.

Neuropatologias são doenças complexas em que se verificam desequilíbrios nas redes dinâmicas de sinalização que definem as tomadas de decisão celulares. A Doença de Alzheimer (DA) está entre as neuropatologias mais comuns e cerca de uma em cada oito pessoas com mais de 65 anos apresenta risco. A DA é uma doença neurodegenerativa relacionada com a idade e de início insidioso (Kelley and Petersen, 2007). É uma patologia difícil de diagnosticar, em particular numa fase precoce, podendo ainda ser confundida com outras condições como défice cognitivo ligeiro, demência de Corpus de Lewy e depressão. Este quadro clínico dificulta o diagnóstico da DA e de outras demências e até mesmo a monitorização da eficácia de novas terapias.

A construção de redes moleculares na área das neuropatologias apresenta-se como uma metodologia multidisciplinar (saúde, biologia celular, biologia molecular e informática)

que irá contribuir para o nosso conhecimento. Muitas redes são construídas a partir das interações regulatórias de genes (gene regulatory interactions – GRI) ou das ligações proteína:proteína (protein:protein interactions – PPI). Na célula, as proteínas têm funções do foro estrutural, enzimático, sinalizador e formam complexos proteicos de modo a cumprir as várias funções fisiológicas. Nas redes PPI, as proteínas são representadas por nós; dois nós estão conectados quando as proteínas ligam-se e interagem fisicamente. Os ‘hubs’ afetam várias vias de sinalização e por sua vez surgem como potenciais candidatos moleculares para fins de diagnóstico e terapia. Nós isolados também podem ser alvos importantes se estiverem associados a uma função ou característica biológica específica a uma patologia. O alvo (‘hub’ vs nó isolado) depende da opção entre uma resposta global ou mais específica.

Proteínas chave já foram identificadas em várias neuropatologias. Tomemos como exemplo a alfa-sinucleína na doença de Parkinson (DP), ou a Tau e a APP (Proteína Precursora de Alzheimer) na DA. Por sua vez vários interactomas destas proteínas já foram descritos (Bai et al 2008). PPIs impactam processos celulares como o tráfico e processamento intracelular da APP. As PPIs podem ser reguladas em larga medida pela fosforilação proteica, um processo fundamental para a memória, função e sinalização neuronal e transmissão sináptica. Neuropatologias por sua vez revelam perfis anormais de fosforilação proteica, por exemplo a DP, Doença de Huntington (DH) e DA. A alfa-sinucleína, cuja função é regulada por fosforilação, é um componente maioritário nos Corpos de Lewy, que estão associados à DP (Okochi et al 2000). Défices motores e cognitivos na DH estão associados à disfunção e morte neuronal, onde a fosfoproteína sinapsina I tem um papel relevante na neurotransmissão. Nos ratinhos que expressam a mutação DH, a sinapsina I está fosforilada a níveis anormais, afetando a transmissão sináptica (Lievens et al 2002). Na DA as tranças neurofibrilares que se depositam no cérebro acontecem devida à hiperfosforilação da proteína tau e ao peptídeo tóxico que se deposita no cérebro, o Abeta, cuja produção também pode ser modulada por processos de fosforilação (Rebelo et al., 2007). Fica evidente que não basta descrever o interactoma de uma única proteína, mas sim de várias que interagem e ainda dos processos críticos para a sinalização, como a fosforilação de proteínas. Em suma, e dado o facto que na nossa sociedade a esperança média de vida está a aumentar, é urgente identificarmos candidatos a sistemas preditivos nas neuropatologias, recorrendo a diagnósticos que empregam multi-biomarcadores. É ainda relevante realçar que muitas destas patologias parecem partilhar alguns aspetos patológicos, nomeadamente no que diz respeito à formação de complexos oligoméricos e na deposição de agregados proteicos.

Recolha de dados para redes de interação proteína:proteína

As PPIs apresentam um sistema preditivo para identificar plataformas de diagnóstico aplicáveis às neuropatologias, recorrendo a multi-biomarcadores. Um conjunto de biomarcadores devia distinguir entre as várias neuropatologias, em

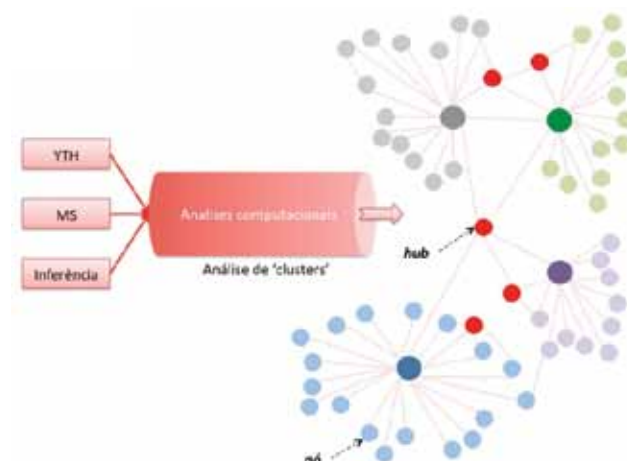


Figura 1 – Metodologia utilizada para elaboração de interactomas. A proteína central, cor escura; e as proteínas a que liga, que é o seu interactoma; cor clara. Cada proteína é um nó, nós com muitas ligações têm a designação de ‘hub’.

particular a DA, dada a sua alta incidência na população. Existem métodos experimentais e computacionais que podem contribuir para este tipo de plataforma, designadamente o desenvolvimento das redes funcionais biológicas (Figura 1). É recomendável que se utilize mais que um método de modo a garantir um interactoma o mais completo possível. Um bom exemplo já foi executado para a Doença de Alzheimer (Soler-Lopez et al., 2010).

A tecnologia de rastreio em levedura por dupla hibridação (Yeast Two Hybrid – YTH), tem vindo a contribuir para a identificação dos interactomas de várias proteínas. No nosso laboratório já identificámos, entre outros, o interactoma da APP e de várias proteínas fosfatases (Esteves et al., 2012 e 2013). O sistema YTH é sensível e pode identificar interações transientes. Neste ‘systems biology approach’ podemos ir um pouco mais além e identificar os complexos triméricos que se formam. De facto este procedimento já foi utilizado para identificar o tricomplexo APP:Fe65:PP1 (Rebelo et al., 2013). Exercícios de ‘data mining’ permitem reunir toda a informação disponível dos YTH relevantes para neuropatologias.

‘In vivo’ a maioria das proteínas funciona em complexos de múltiplas subunidades. Assim é possível purificar uma proteína (utilizando várias metodologias, por afinidade ou imunoprecipitação) e identificar as outras proteínas que co-purificam. A identificação é possível por espectrometria de massa. Esta metodologia também permite a identificação de interactomas.

Bases de dados oferecem uma fonte adicional para identificar PPIs. Existem várias disponíveis, ficam aqui apenas alguns exemplos: DIP - Database of Interacting Proteins (<http://dip.doe-mbi.ucla.edu/dip/Main.cgi>); HPID - Human Protein Interaction Database (<http://wilab.inha.ac.kr/hpid/>); BioGRID - Biological General Repository for Interaction Datasets (<http://thebiogrid.org/>) e IntAct - curated from published protein-protein interaction data (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>).

Também é possível identificar PPIs por inferência. Nomeadamente pesquisas ‘in silico’ de domínios, previamente definidos, que ligam outras proteínas ou estão associados a funções específicas. Novamente aqui será importante recorrer a bases de dados disponíveis.

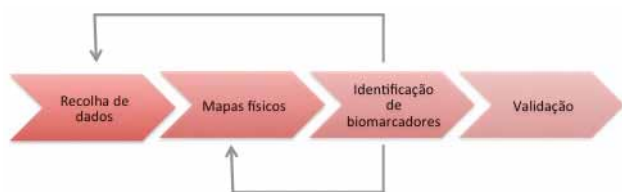


Figura 2 – Esquema aplicado para identificar alvos proteicos para fins clínicos via a utilização de redes.

Os dados recolhidos podem ser sujeitos a análises computacionais para identificar ‘clusters’ (Figura 1). Vários programas estão disponíveis incluindo “Nestedcluster” e “SAINT”, as matrizes PPI são agrupadas de modo a gerar as redes (Goudreault et al 2009; Choi et al 2010).

Redes fisiologicamente relevantes

Toda a informação de PPIs recolhida pode ser apresentada em mapas físicos de redes. As redes biológicas são particularmente relevantes dado que várias patologias humanas têm contributos de muitos processos biológicos; doenças cardiovasculares, cancro e, como aqui focamos, as neuropatologias. A partir dos mapas físicos é possível identificar putativos candidatos a biomarcadores (Figura 1); ‘hubs’ e nós, como acima descrito. Os módulos estruturais refletem os módulos funcionais sendo possível identificar as vias relevantes e potenciando novos biomarcadores e alvos farmacêuticos. Esses candidatos podem ser definidos por meios computacionais, adicionalmente com as novas tecnologias será possível identificar pequenas flutuações e providenciar uma medicina personalizada.

No que diz respeito às neuropatologias algumas vias fisiológicas parecem ser relevantes. Como já referido a agregação proteica é um aspeto comum a muitas neuropatologias e a homeostasia proteica (proteostasia) por sua vez controla a qualidade proteica e o equilíbrio entre o dobramento de proteínas, a degradação e a agregação (Ketter et al., 2010). As várias vias não atuam isoladamente mas sim de um modo coordenado de maneira a salvaguardar a integridade do proteoma celular. É evidente que entender todos os mecanismos subjacentes à agregação proteica é fundamental para a compreensão destas patologias em toda a sua dimensão. Justifica-se assim a necessidade de descrever as várias proteínas/interactoma que liga a uma proteína central para a neuropatologia em questão. As redes mapeadas e os módulos estruturais identificados podem ainda revelar subredes de interações proteicas partilhadas por várias neuropatologias. É expectável que algumas das subredes resultantes irão remeter para a agregação proteica, por exemplo.

Candidatos para aplicação na prática clínica têm que ser validados (Figura 2). No caso em análise a validação terá que ser efetuada em tecidos humanos, de preferência periféricos. Os processos de validação são complexos e para uso no ambiente clínico têm que ser devidamente confirmados. No que diz respeito a neuropatologias existem iniciativas a nível Europeu para validar os poucos biomarcadores atualmente disponíveis (por exemplo: Abeta, Tau e Tau fosforilado) e garantir o controlo da qualidade.

Conclusão

Tendencialmente na biomedicina focamos-nos numa única patologia, via de sinalização, proteína ou gene. No entanto as proteínas não atuam isoladamente mas sim numa rede altamente interligada. Por outro lado os progressos atuais apresentam outras possibilidades para iniciar o estudo destas redes biológicas, nomeadamente se considerarmos a biologia de sistemas. Esta área do conhecimento é altamente multidisciplinar, envolvendo também a investigação translacional no que diz respeito à validação dos alvos para fins terapêuticos, diagnósticos e prognósticos. Os ‘hubs’ e nós podem ser aplicados nas tecnologias de biossensores, providenciando uma resposta genérica ou específica. As mesmas tecnologias podem ainda contribuir para uma medicina personalizada e assim representam uma aposta forte para o futuro na medicina.

Referências

- Bai Y, Markham K, Chen F, Weerasekera R, Watts J, Horne P, Wakutani Y, Bagshaw R, Mathews PM, Fraser PE, Westaway D, St George-Hyslop P, Schmitt-Ulms G. The in vivo brain interactome of the amyloid precursor protein. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Jan;7(1):15-34. Epub 2007 Oct 13.
- Choi H, Kim S, Gingras AC, Nesvizhskii AI. Analysis of protein complexes through model-based biclustering of label-free quantitative AP-MS data. *Mol Syst Biol*. 2010 Jun 22;6:385. doi: 10.1038/msb.2010.41.
- Esteves SLC, Domingues SC, da Cruz e Silva OAB, Fardilha M and da Cruz e Silva EF. Protein Phosphatase 1alpha Interacting Proteins in the Human Brain. *Omics-a Journal of Integrative Biology* Volume: 16 Issue: 1-2 Pages: 3-17 Published: FEB 2012
- Esteves SLC, Korrodi-Gregório L, Cotrim CZ, van Kleef PJM, Domingues SC, da Cruz e Silva OAB, Fardilha M and da Cruz e Silva EF. Protein Phosphatase 1 gamma Isoforms Linked Interactions in the Brain. *Journal of Molecular Neuroscience* Volume: 50 Issue: 1 Pages: 179-197 Published: MAY 2013
- Goh KI, Cusick ME, Valle D, Childs B, Vidal M, Barabási AL. The human disease network. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 22;104(21):8685-90. Epub 2007 May 14.
- Goudreault M, D'Ambrosio LM, Kean MJ, Mullin MJ, Larsen BG, Sanchez A, Chaudhry S, Chen GI, Sicheri F, Nesvizhskii AI, Aebersold R, Raught B, Gingras AC. A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Jan;8(1):157-71. doi: 10.1074/mcp.M800266-MCP200. Epub 2008 Sep 8.
- Hartwell LH, Hopfield JJ, Leibler S, Murray AW. From molecular to modular cell biology. *Nature*. 1999 Dec 2;402(6761 Suppl):C47-52.
- Kelley BJ, Petersen RC. Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurol Clin*. 2007 Aug;25(3):577-609, v. Review.
- Ketter N, Dreisidler M, Tawo R, Höfheld J. Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. *Biol Chem*. 2010 May;391(5):481-9. doi: 10.1515/BC.2010.058.
- Liévens JC, Woodman B, Mahal A, Bates GP. Abnormal phosphorylation of synapsin I predicts a neuronal transmission impairment in the R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *Mol Cell Neurosci*. 2002 Aug;20(4):638-48.
- Okochi M, Walter J, Koyama A, Nakajo S, Baba M, Iwatsubo T, Meijer L, Kahle PJ, Haass C. Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *J Biol Chem*. 2000 Jan 7;275(1):390-7.
- Rebelo S, Vieira SI, Esselmann H, Wiltfang J, da Cruz e Silva EF and da Cruz e Silva OAB. Tyr(687) dependent APP endocytosis and Abeta production. *Journal of Molecular Neuroscience* Volume: 32 Issue: 1 Pages: 1-8 Published: 2007
- Rebelo S, Domingues SC, Santos M, Fardilha M, Esteves SLC, Vieira SI, Vinthém APB, Wu W, da Cruz e Silva EF and da Cruz e Silva OAB. Identification of a Novel Complex A beta PP:Fe65:PP1 that Regulates A beta PP Thr(668) Phosphorylation Levels. *Journal of Alzheimer's Disease* Volume: 35 Issue: 4 Pages: 761-775 Published: 2013
- Soler-López M, Zanzoni A, Lluís R, Stelzl U, Aloy P. Interactome mapping suggests new mechanistic details underlying Alzheimer's disease. *Genome Res*. 2011 Mar;21(3):364-76. doi: 10.1101/gr.114280.110. Epub 2010 Dec 16.
- Wang Z, Zhang J. In search of the biological significance of modular structures in protein networks. *PLoS Comput Biol*. 2007 Jun;3(6):e107. Epub 2007 Apr 30. Erratum in: *PLoS Comput Biol*. 2007 Jul;3(7):e146.

Ficha Técnica

Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia
Publicação Quadrimestral . Série 2 - Número 4
Novembro 2013

Propriedade

Sociedade Portuguesa de Biotecnologia

Direcção

Presidente - José António Teixeira
Vice-Presidente - Maria Raquel Aires Barros
Secretário Geral - Eugénio Campos Ferreira
Tesoureiro - Manuel Coimbra da Silva
Vogal - Timothy Alun Hogg

Editores

José António Teixeira
Maria Raquel Aires Barros
Lígia O. Martins
Jorge H. Leitão

Paginação e Design

Dossier Comunicação e Imagem

Execução gráfica

Dossier Comunicação e Imagem
Tiragem - 1000 exemplares
Depósito Legal - 187836/02
ISSN - 1645-5878

Sócios Colectivos da SPBT

Amersham Bioscience Europe GmbH
Instituto Piaget

FIPA – Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares
APIM – Associação Portuguesa da Indústria de Moagem e Massas
PROENOL – Indústria Biotecnológica, Lda.
PACI – Material Científico e Industrial, S.A.
VWR International – Material de Laboratório, S.A.
Laboratórios BIAL – Portela & Companhia, S.A.
INETI – Instituto de Engenharia e Tecnologia Industrial
CIPAN – Companhia Produtora de Antibióticos, S.A.
IZASA Portugal Distribuições Técnicas, Lda.
PIONEER HI-BRED Sementes de Portugal, S.A.
Escola Superior de Biotecnologia
RAR – Refinarias de Açúcar Reunidas, S.A.
Bayer Cropscience (Portugal) – Produtos para a Agricultura, Lda.
IBET – Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica



Imagem de capa - Detalhe de neurosfera de células estaminais neurais humanas derivadas de mesencéfalo após diferenciação. Detecção por imunofluorescência de neurónios (ßIII-tubulina - verde) e astrócitos (GFAP - vermelho), com núcleos marcados por TO-PRO3 (azul).

Da página 17: "Sistemas de cultura 3D para diferenciação neural de células estaminais humanas", Daniel Simão, Catarina Pinto, Margarida Serra, Catarina Brito, Paula M. Alves, iBET/ITQB-UNL



YOUPLATEIT!

SECUENCIACIÓN LOW-COST DE ADN EN PLACA DE 96 POCILLOS

249 Por sólo
€/placa

www.stabvida.com

1 YOUPLATEIT
Cliente envía en cada pocillo Primer + ADN mezclados
ADN: 800 ng (plásmido)
o 10 ng por cada 100 pb de productos PCR
+ Primer: 10 pmoles

**2 ENVIO GRATUITO
PARA LABORATORIO
DE STAB VIDA (24H POR SEUR)**

3 24-48 H: STAB VIDA
Añade big dye, ejecuta la reacción de secuenciación y hace Run en el secuenciador. El resultado se envía al cliente por internet y correo electrónico. Sin el derecho a repetir.

YOUPLATEIT!
GENÉTICA PARA PROFESIONALES



NEXT-GEN EM PORTUGAL COM A STAB VIDA

QUALIDADE CERTIFICADA ISO 9001

WWW.STABVIDA.COM



- TEMPO DE TRANSPORTE DAS AMOSTRAS REDUZIDO!
- FÁCIL COMUNICAÇÃO
- POSSIBILIDADE DE "LEARNING-BY-DOING" NO NOSSO LABORATÓRIO

FAZEMOS ORÇAMENTO À MEDIDA.
WWW.STABVIDA.COM | INFO@STABVIDA.COM

COMPRE O QUE É NOSSO!

STAB vida
Your easy genetics laboratory
Lisboa - Porto - Madrid - São Paulo - Milano