



FACULDADE • DE • CIÊNCIAS UNIVERSIDADE • DE • LISBOA

# MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E BIOTECNOLOGIA

## BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

### **Diferenciação de linhagens celulares neuronais para o estudo da Doença de Alzheimer por reprogramação de queratinócitos humanos, a partir da indução de pluripotência**

Ana Amorim, Nuno Domingues e Susana Silvestre

Lisboa, 2010

## Desdiferenciação de células somáticas de modo a obter células com características de pluripotência

### Extractos Celulares:

- Permeabilização membrana;
- Extracto de células com reguladores nucleares;
- Possibilidade de rediferenciar em múltiplas linhagens;
- Simples.

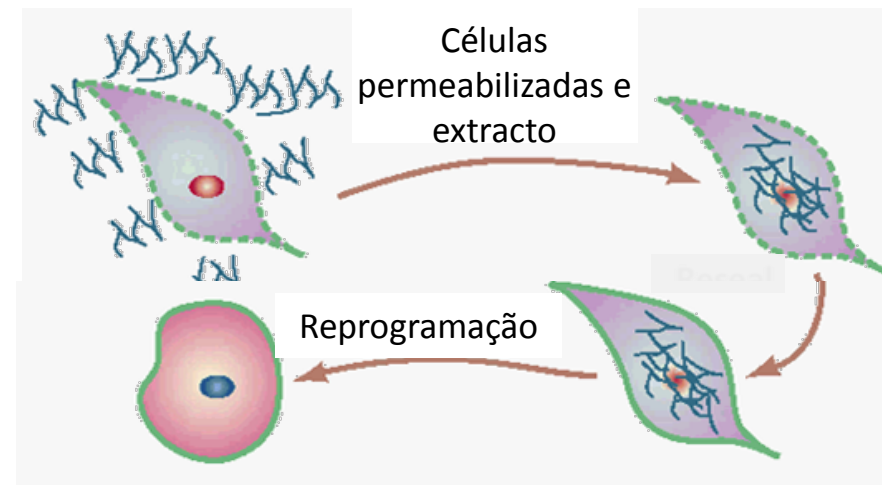


Fig. 1 – Reprogramação a partir de extractos celulares

### Moléculas sintéticas:

- Conduz células a novos fenótipos;
- Não se percebe modo de acção;
- Não se sabe as relações com mecanismos epigenéticos.

## Transferência Nuclear Somática:

- Capacidade de reprogramação diminui com a diferenciação da célula somática;
- Pouco sucesso em células humanas.

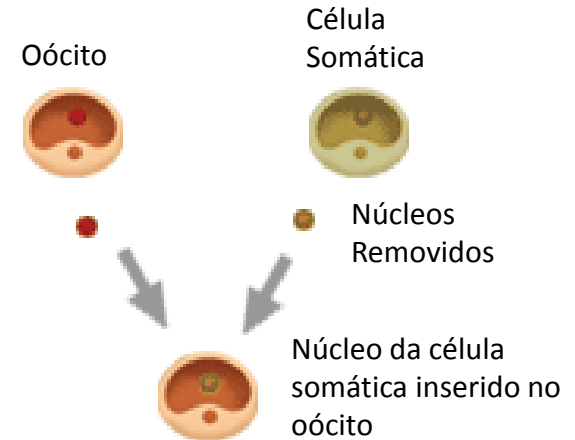
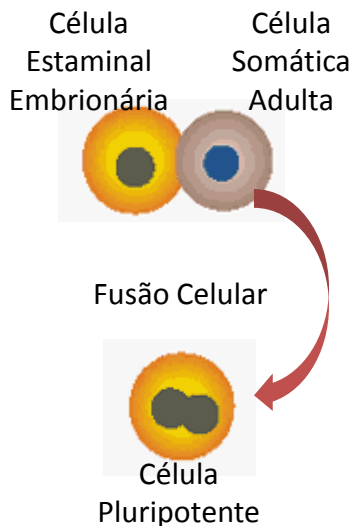


Fig. 2 – Reprogramação celular por transferência nuclear somática .



## Fusão Celular:

- Possibilidade de tetraploidia;
- Remoção dos núcleos das células estaminais é difícil;
- Inibe a capacidade do citoplasma reactivar a expressão de marcadores pluripotência.

Fig. 3 – Reprogramação por fusão celular.

# Indução de pluripotência

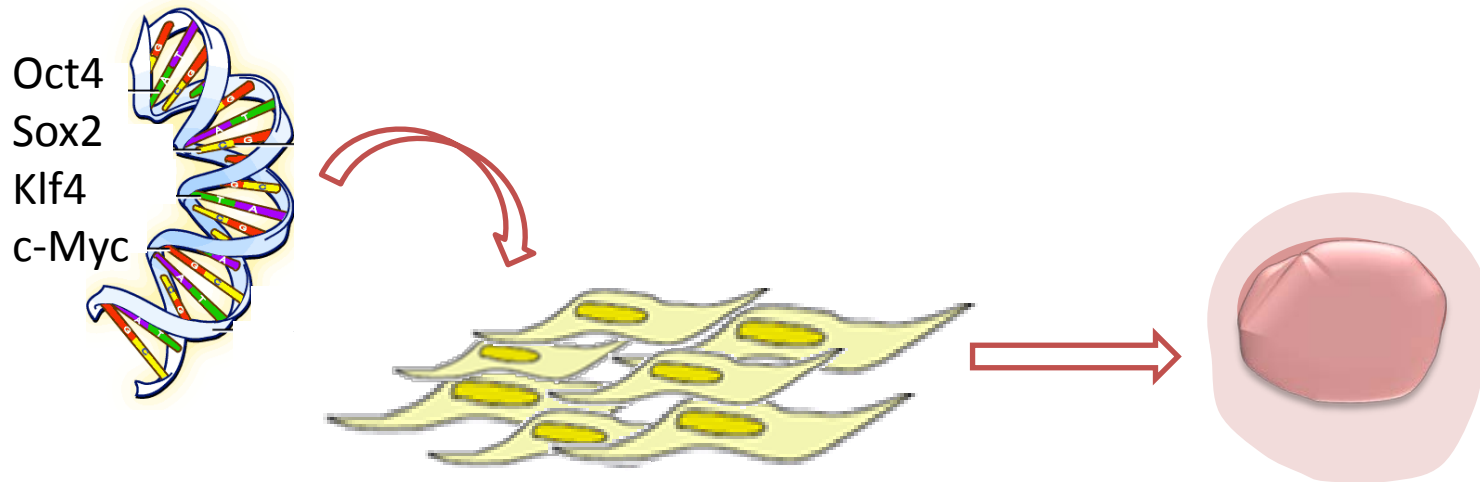


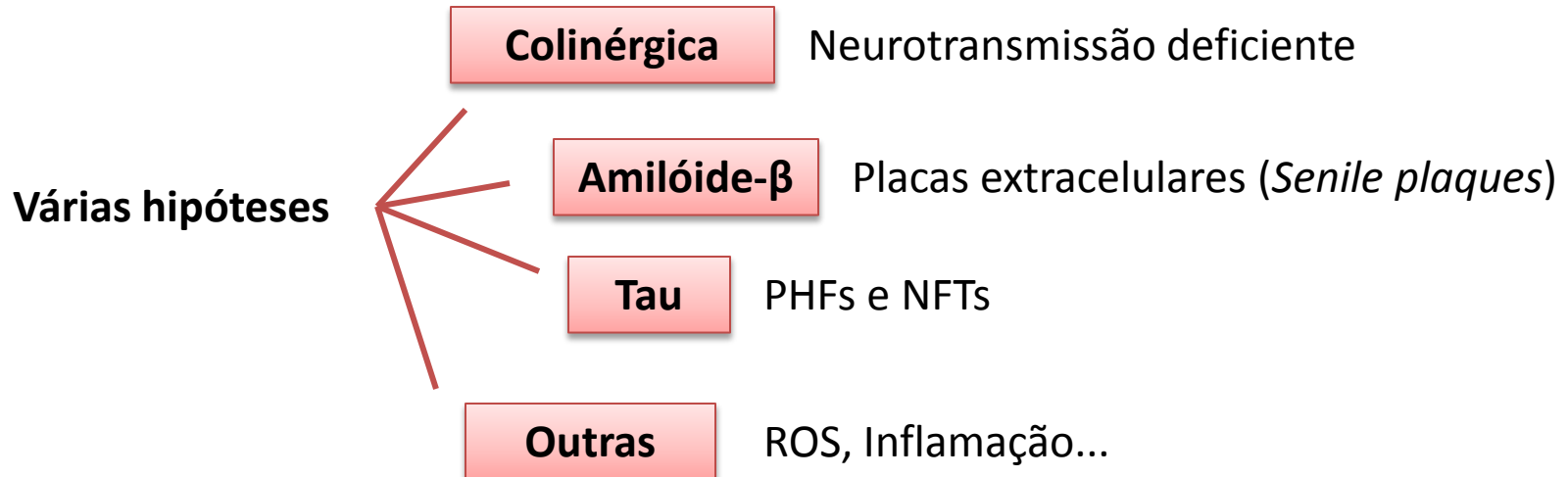
Fig. 4 – Reprogramação celular por indução de pluripotência em células somáticas.

| Vantagens                                                  | Desvantagens                                                        |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Crescimento e morfologia semelhantes a células estaminais  | c-Myc e Klf4 são oncogenes, com elevada probabilidade de mutagénese |
| Método de estudo para muitas doenças e potenciais fármacos | Eficiência de reprogramação baixa                                   |
| Possibilidade de terapia génica específica do paciente     |                                                                     |

# Doença de Alzheimer

**Neurodegeneração que leva a progressivas perdas de memória e cognitivas**

35 milhões de pessoas, com tendência a aumentar...



**Desconhece-se como se relacionam na totalidade**

# Doença de Alzheimer - amilóide $\beta$

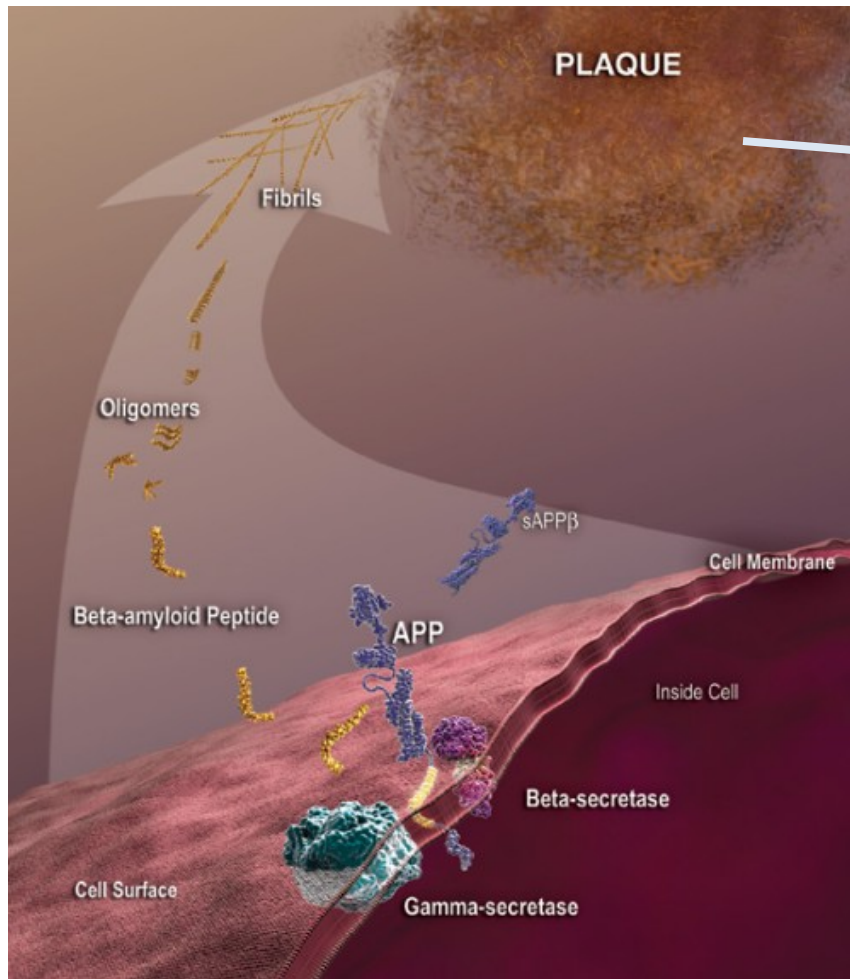


Fig.5 – Formação de placas.

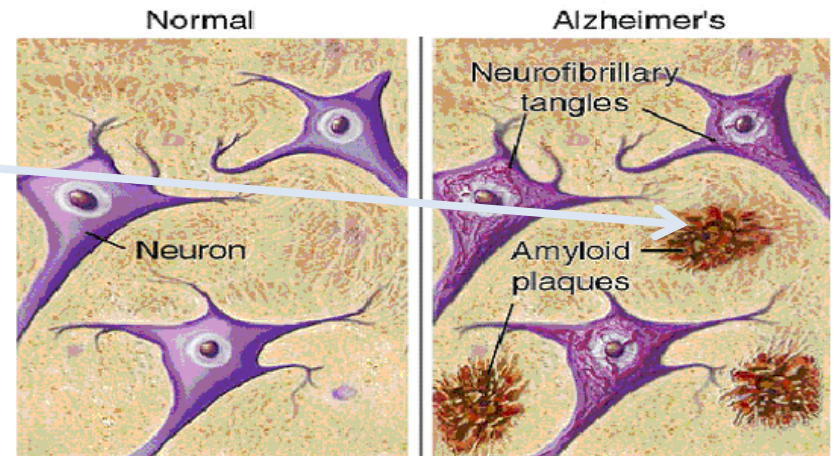


Fig.6 - Diferença entre tecido saudável e na doença de Alzheimer.

**APP – Proteína precursora da amilóide**

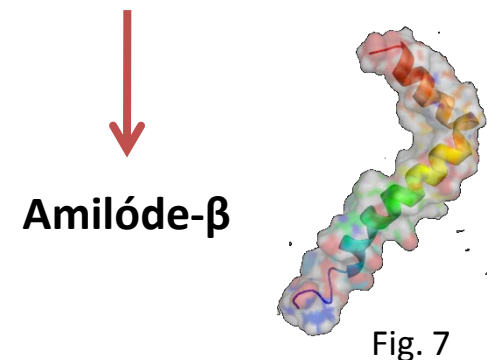


Fig. 7

# Doença de Alzheimer - amilóide $\beta$

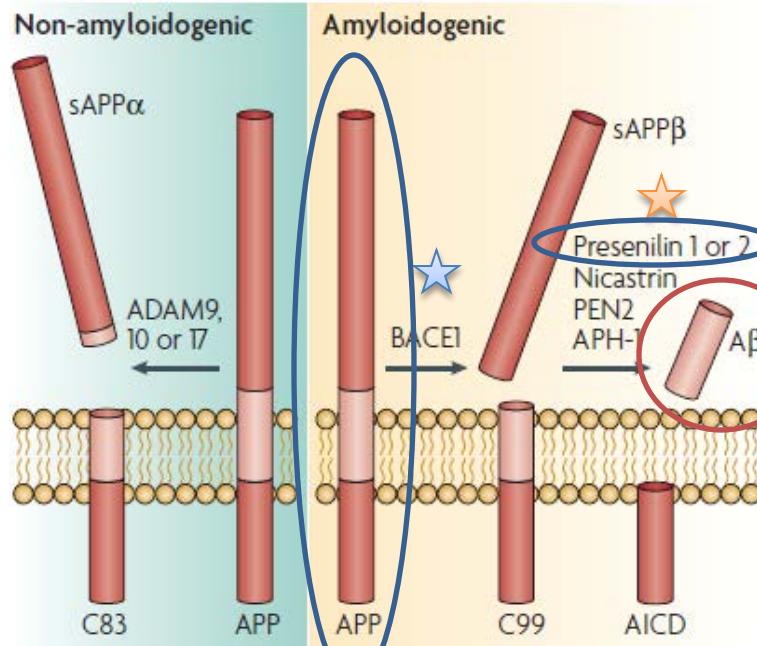
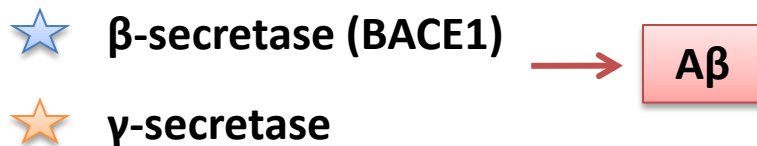


Fig.8 – Actividade enzimática sobre APP (LaFerla, 2007).



**Perturbação da transmissão de sinal nas sinapses**

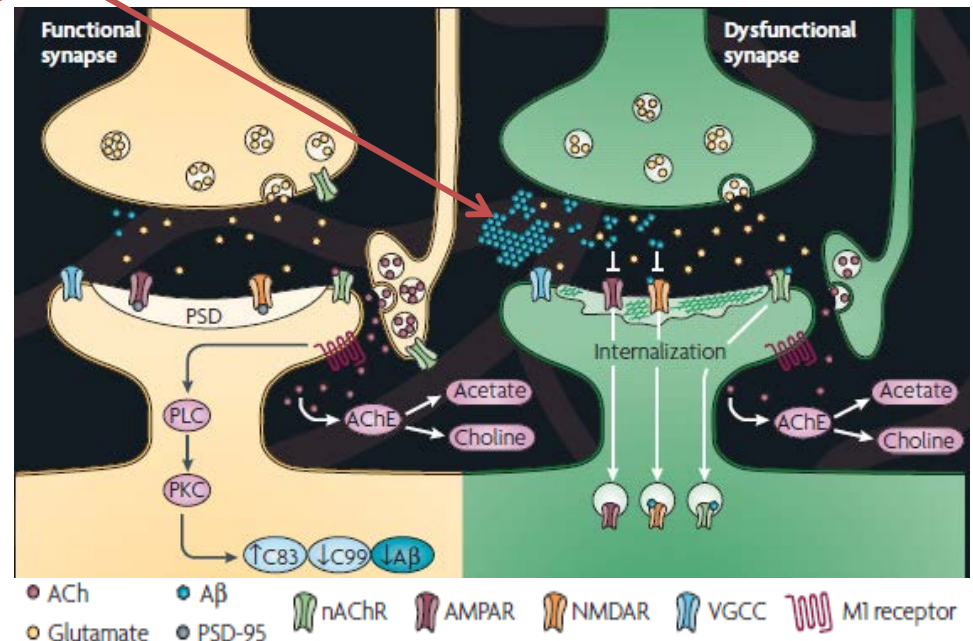


Fig. 9 – Actividade enzimática sobre APP (LaFerla, 2008).

# Doença de Alzheimer - Tau

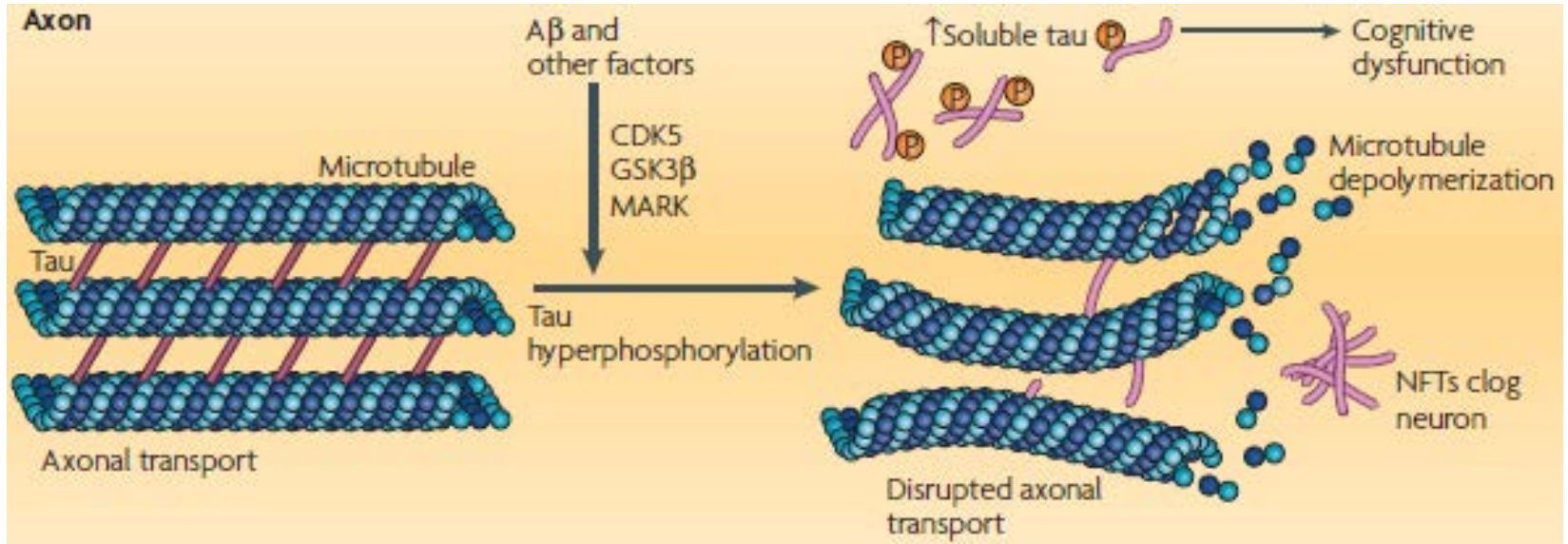


Fig. 10 – Tau e a destabilização dos microtúbulos (LaFerla, 2008)

- Destabilização dos microtúbulos
- Tau hiperfosforilada sequestra tau normal

Transporte de componentes celulares perturbado

# Doença de Alzheimer - pleiotropia

- Stress oxidativo
- Inflamação aberrante
- ...

Só actuar sobre um factor não  
irá curar a doença

É necessário saber como todas estas  
causas/efeitos se relacionam!

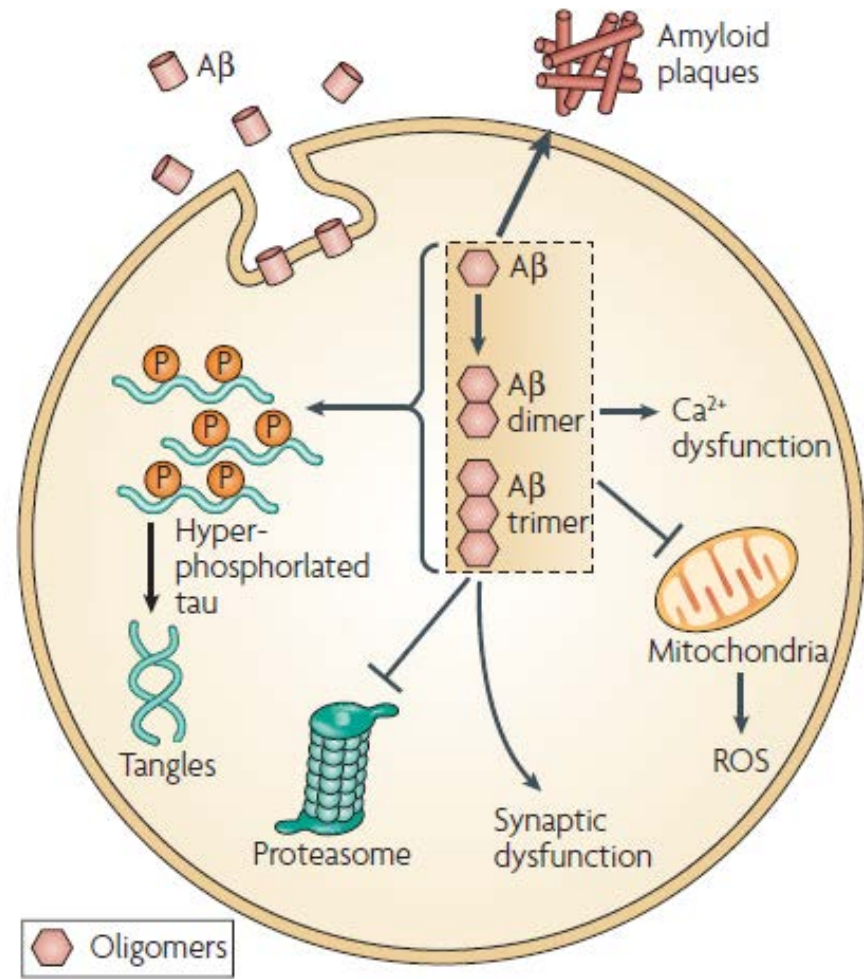
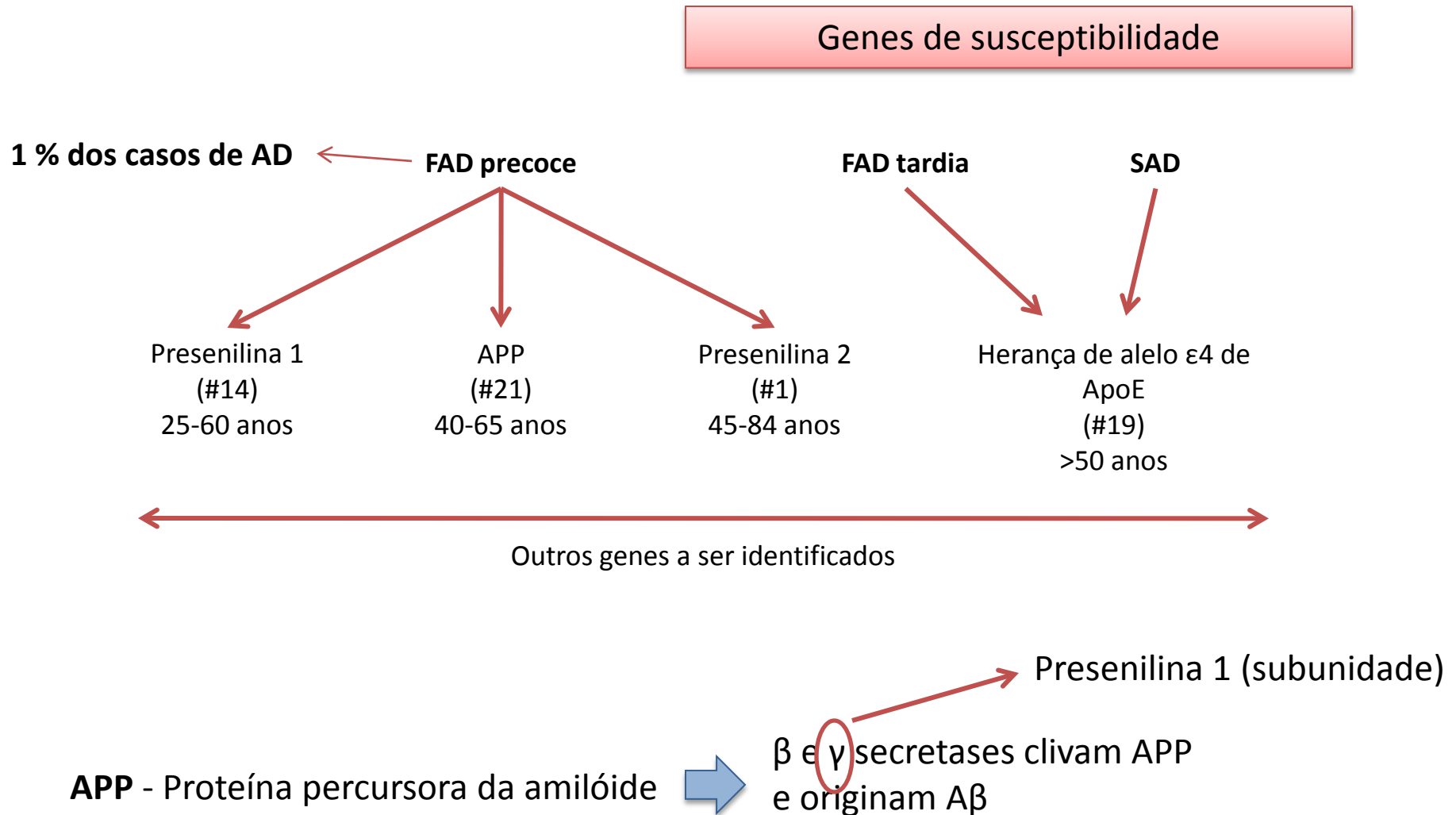


Fig.11 – Vários dos mecanismos que se observam na doença de Alzheimer (LaFerla, 2007)..

# Doença de Alzheimer – alvos terapêuticos

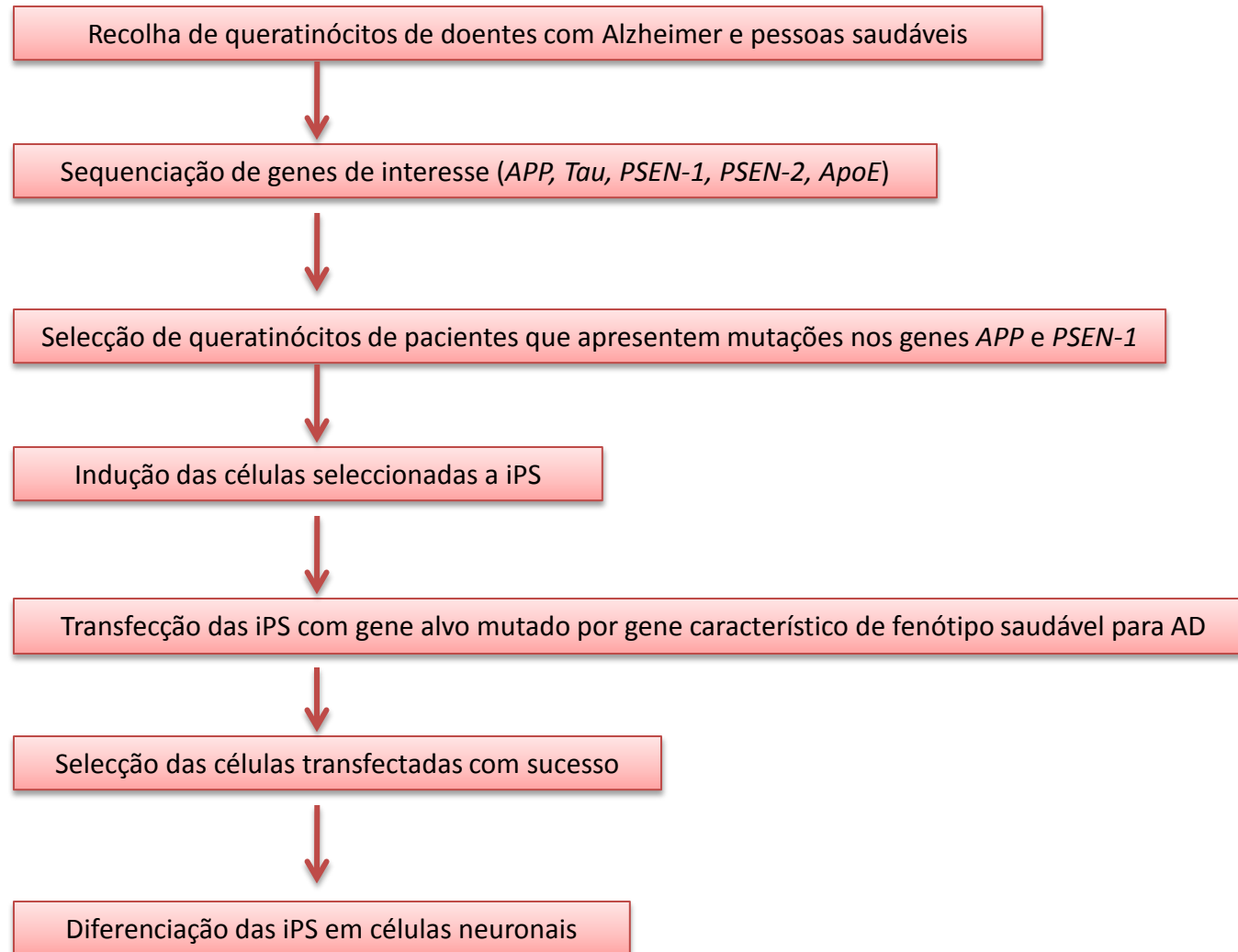
| ALVOS                              | EFEITO ESPERADO                            | ABORDAGEM                                                                      |
|------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tau</b>                         | Impedir hiperfosforilação                  | Inibidores de cinases, estabilizadores de microtúbulos...                      |
| <b>Amilóide-<math>\beta</math></b> | Inibir formação de placas                  | Imunoterapia, inibidores de secretases $\beta$ e $\gamma$ ...                  |
| <b>Neurotransmissores</b>          | Melhorar neurotransmissão                  | Agonistas ou antagonistas de receptores, inibidores de acetilcolinesterase ... |
| <b>Inflamação</b>                  | Diminuição da inflamação                   | Anti-inflamatórios                                                             |
| <b>Stress oxidativo</b>            | Diminuição de ROS                          | Anti-oxidantes                                                                 |
| <b>Prevenção</b>                   | Redução de factores de risco               | Redução do colesterol, dieta, estilo de vida...                                |
| <b>Reparação e neuroprotecção</b>  | Aumentar mecanismos de reparação/protecção | Terapia génica, celular, substituição de hormonas...                           |

# Doença de Alzheimer Familiar (FAD)



1. Obter linhas celulares para estudo dos mecanismos da doença, teste de fármacos, farmacogenética
2. Abrir caminho para terapia à AD com recurso à reprogramação celular de células somáticas

# Metodologia pretendida



# Metodologia – Indução de pluripotência



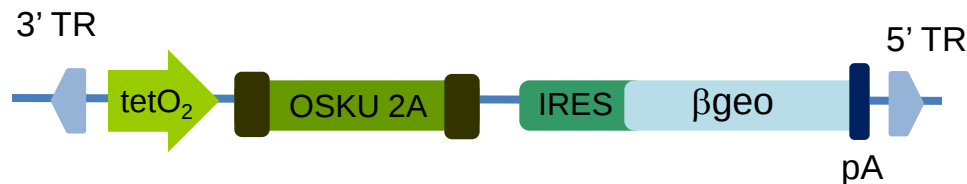
Meio sem soro e com baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$



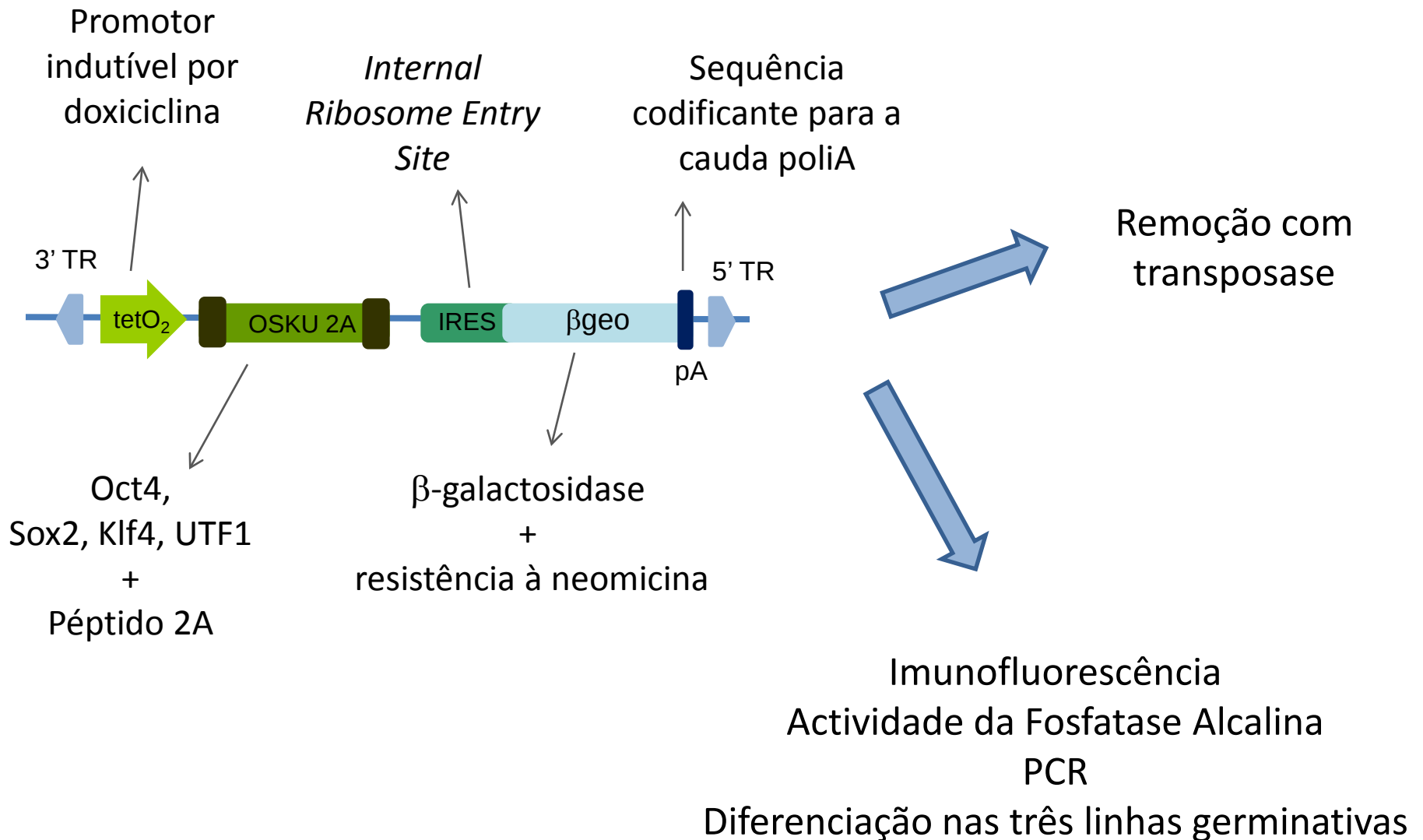
Meio típico de células estaminais, com KnockOut™ Serum Replacement



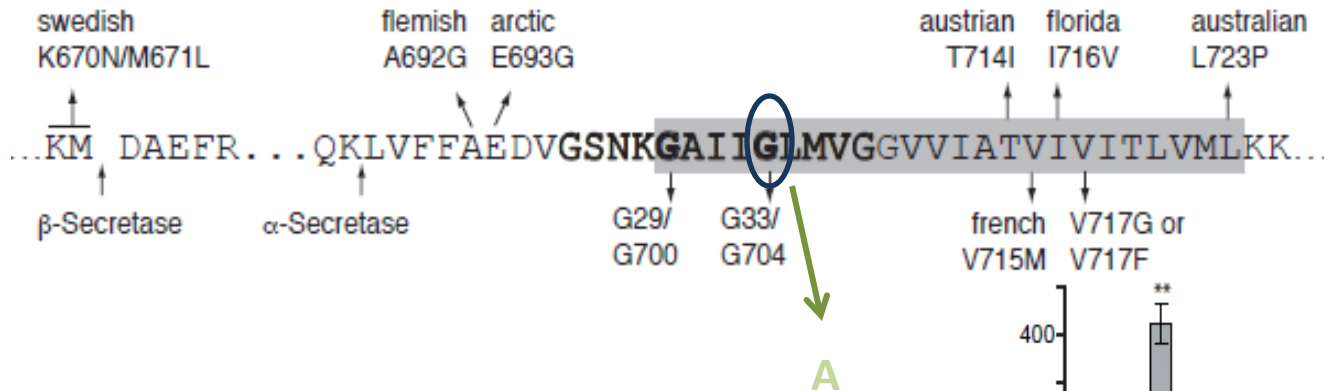
**TRANSFEÇÃO** com  
transposição *piggyBac*



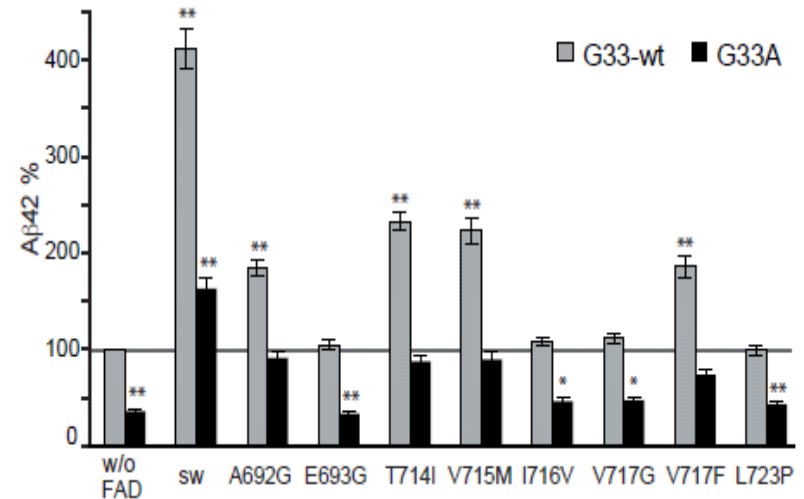
# Metodologia – Transposição *PiggyBac*



# Metodologia – Mutagénese dirigida



RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA



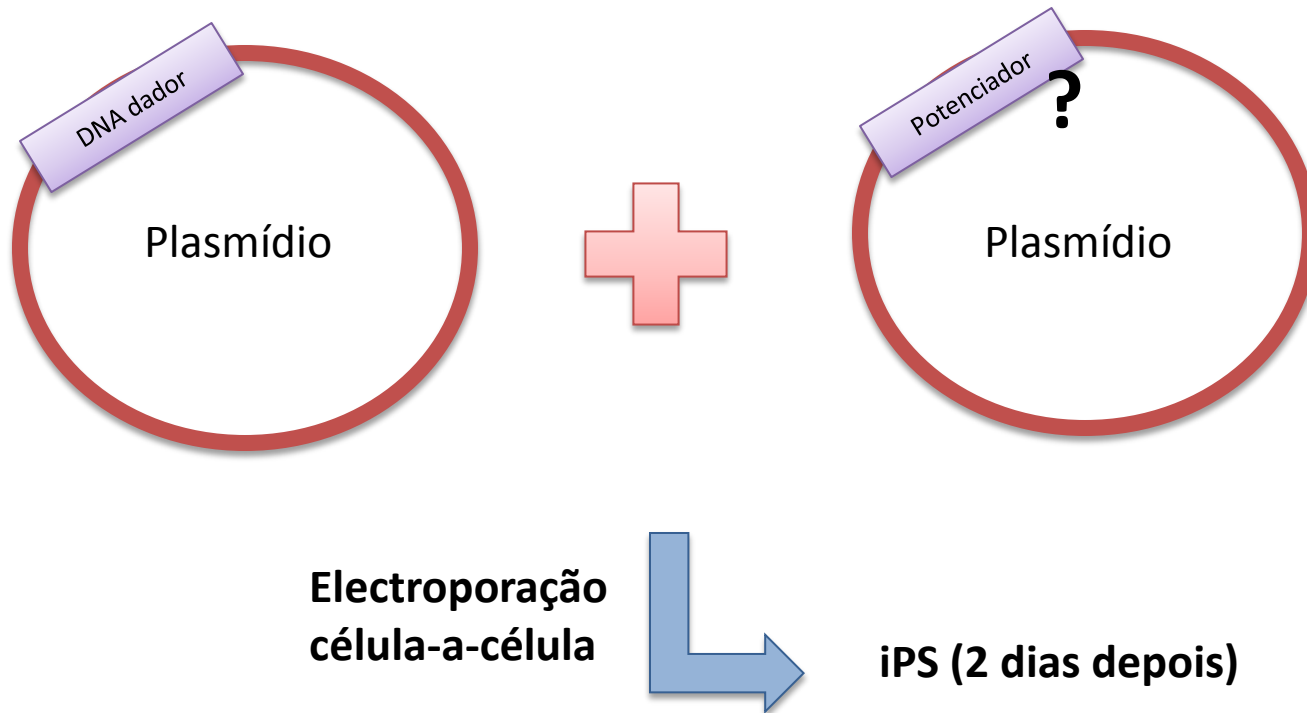
Para diminuir a produção de Aβ

Plasmídio com:

.Ou Gene **APP** com mutação no motivo GxxxG (G33A)

.Ou **presenilina 1** (PSEN-1) de humano saudável – causar mutação que origine o fenótipo saudável

# Potenciação da recombinação homóloga

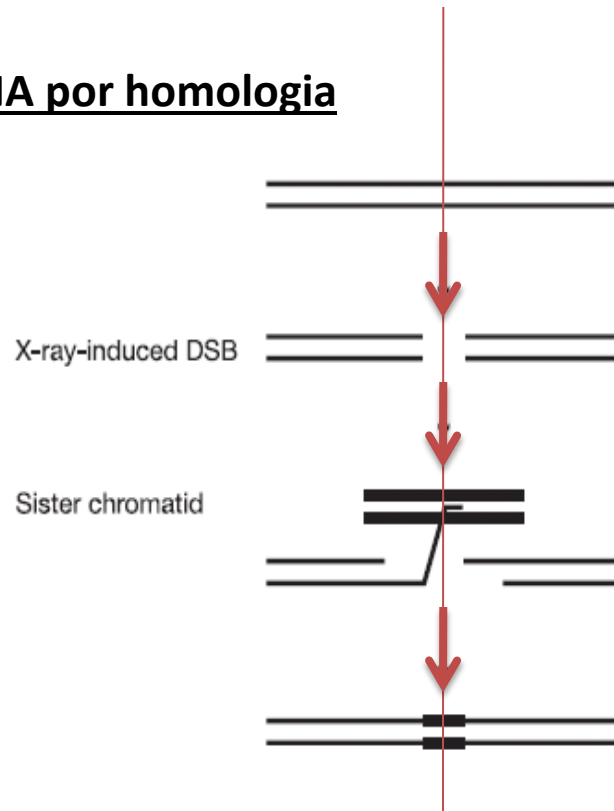


## Potenciador:

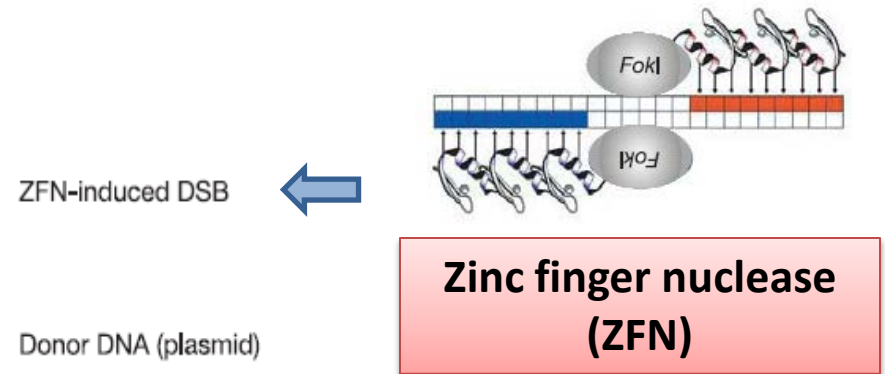
- *Zinc finger nuclease?*
- *ARCUT (artificial restriction DNA cutter)?*

# Potenciação da recombinação homóloga

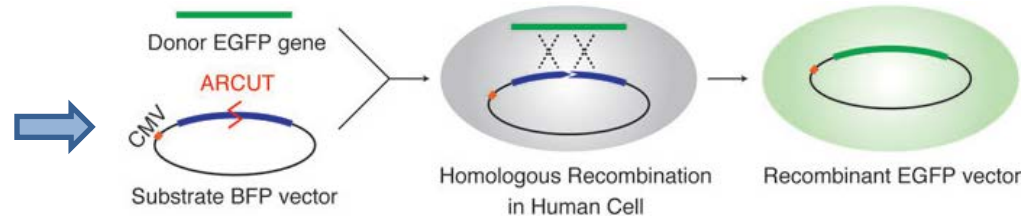
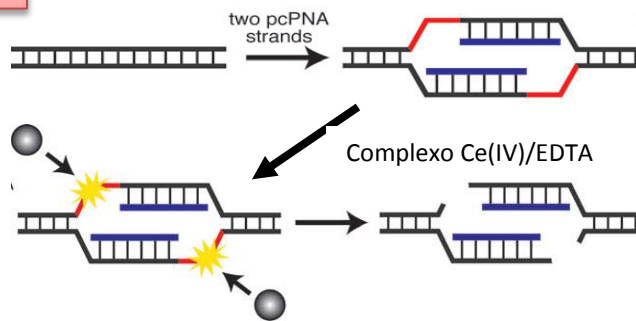
## Reparação de DNA por homologia



## Reparação mediada por ZFN



## ARCUT



# Potenciação da recombinação homóloga

## Reparação de DNA por homologia

repair

## Reparação mediada por ZFN

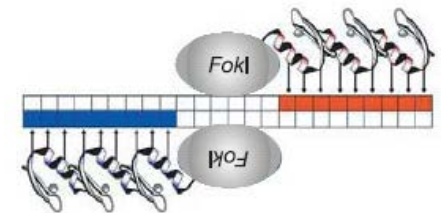
directed repair

X-ray-induced DSB

ZFN-induced DSB

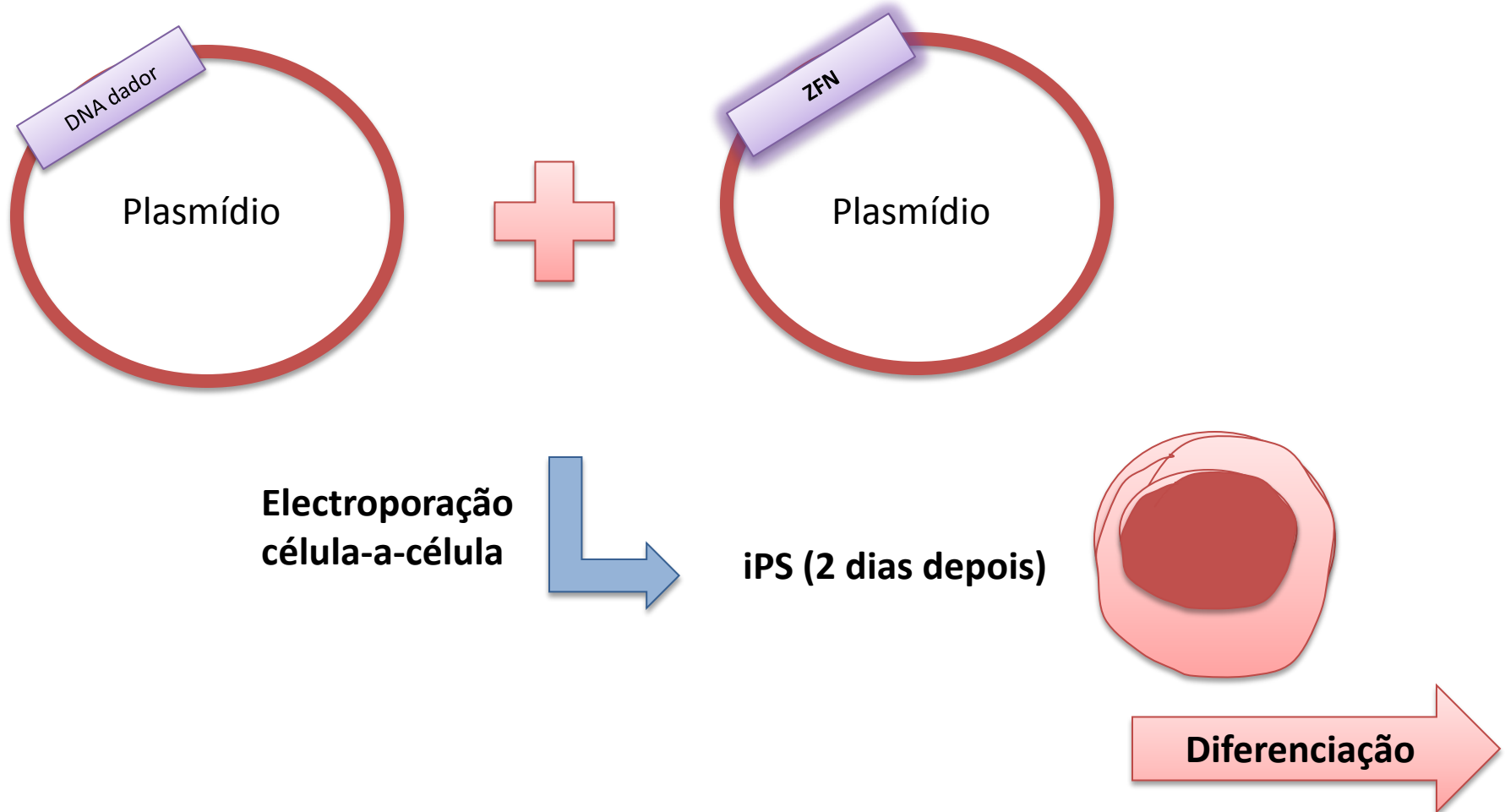
Sister chromatid

Donor DNA (plasmid)

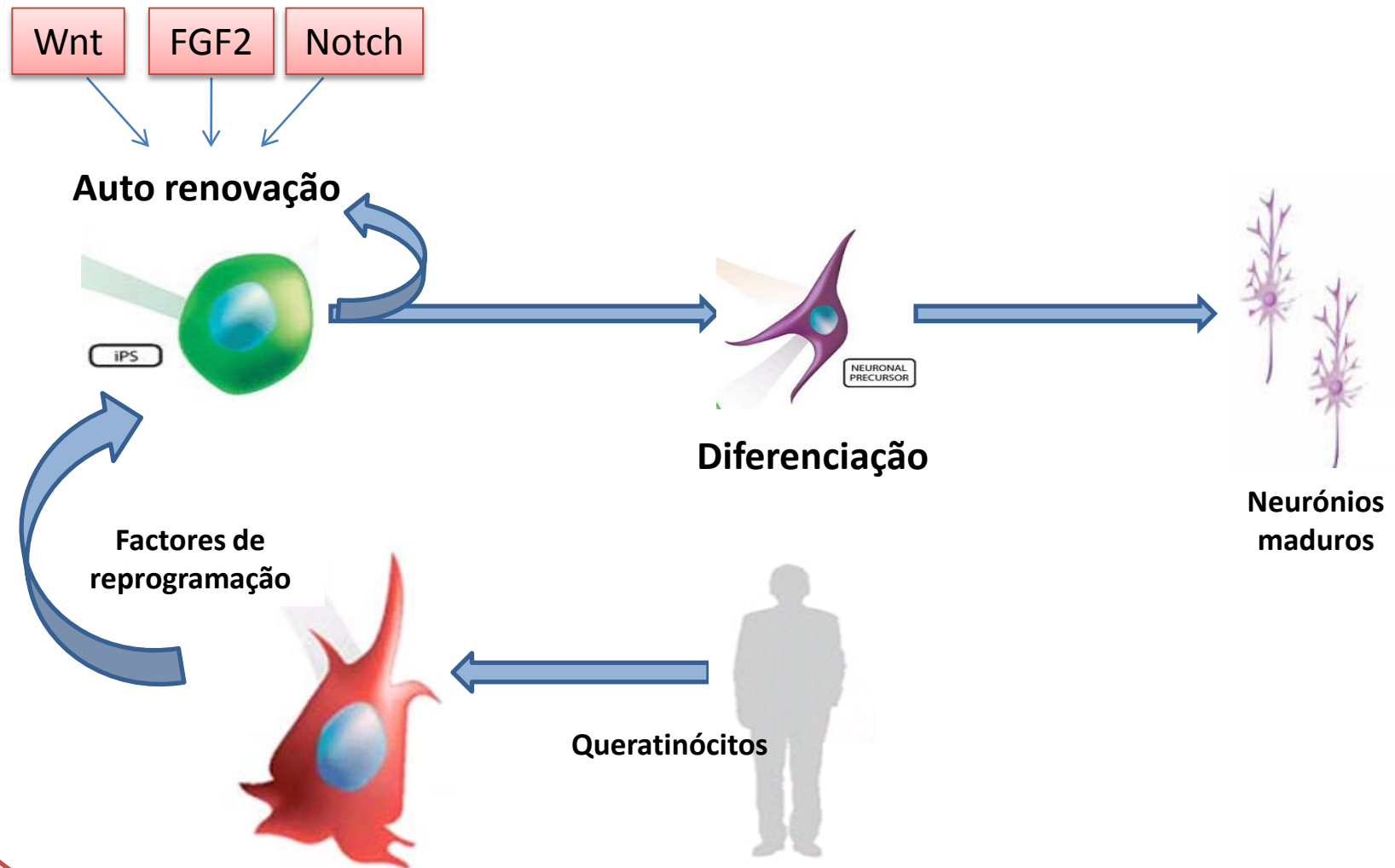


**Zinc finger nuclease  
(ZFN)**

# Potenciação da recombinação homóloga



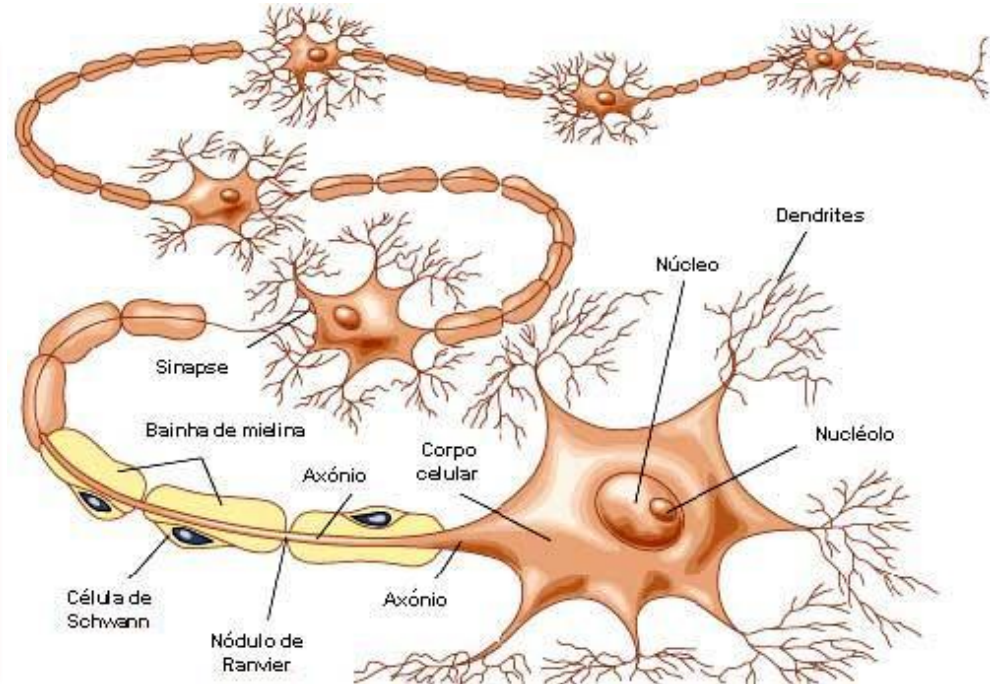
# Metodologia – Diferenciação neuronal



# Metodologia – Diferenciação neuronal

## Características de células neuronais:

- Polaridade;
- Morfologia complexa;
- Presença de canais iônicos;
- Pico do potencial de acção;
- Potencial de repouso da membrana;
- Resistência de entrada da membrana;
- Capacitância da membrana.



## Funcionalidade das células neuronais:

- Correntes IPSCs e EPSCs.

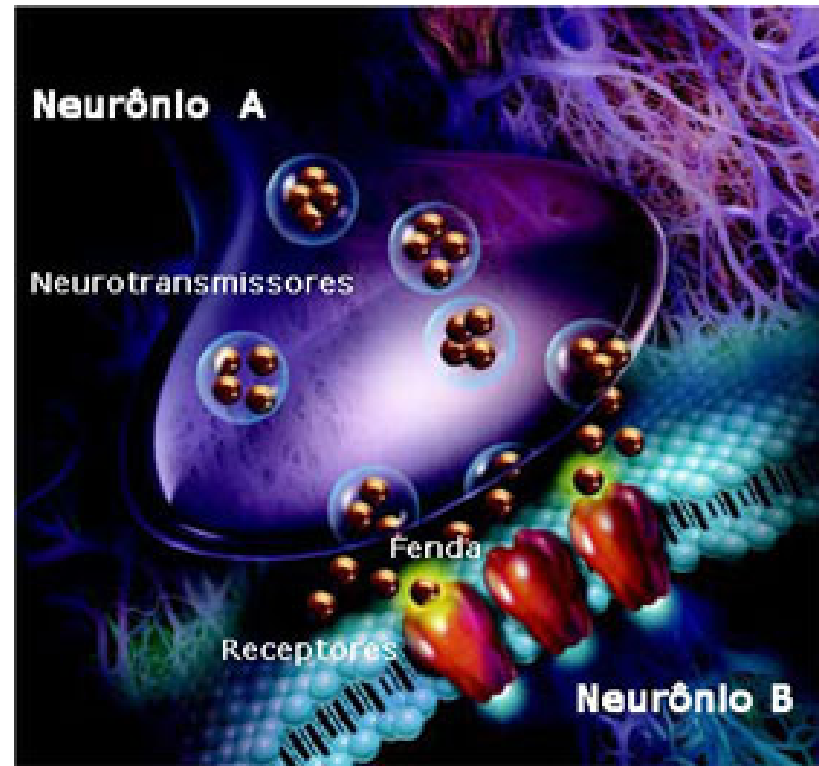
- Eficiência de conversão:

$$\frac{\text{Nº total de células iPS}}{\text{Nº de células diferenciadas}}$$

# Metodologia – Diferenciação neuronal

## Fenótipo dos neurotransmissores nas células neuronais:

- Acetilcolina;
- Norepinefrina;
- Glutamato;
- GABA ( *$\gamma$ -Aminobutyric Acid*);
- TH (Tirosina Hidroxilase);
- Periferina.



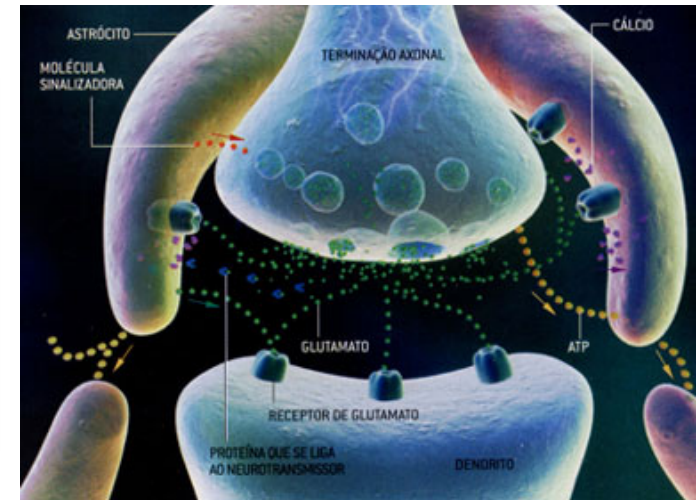
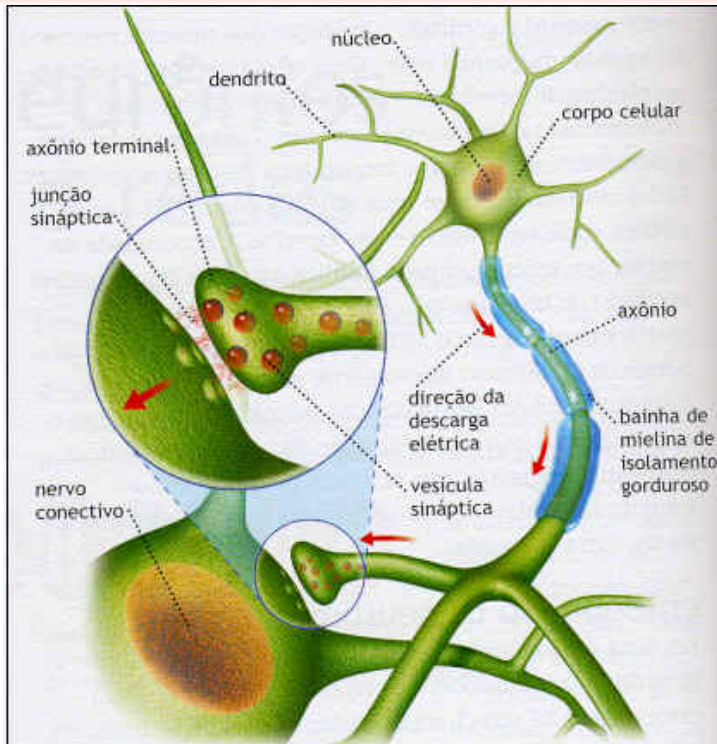
## Deteção de sinapses nas células neuronais:

- Sinapasina 1;
- Sinaptofisina.

# Metodologia – Diferenciação neuronal

## Determinação da funcionalidade das sinapses:

- Detectar a existência de ligações neuronais entre si;
- Meio de neurónios corticais;
- EPSCs evocadas e espontâneas;
- IPSCs evocadas espontâneas.

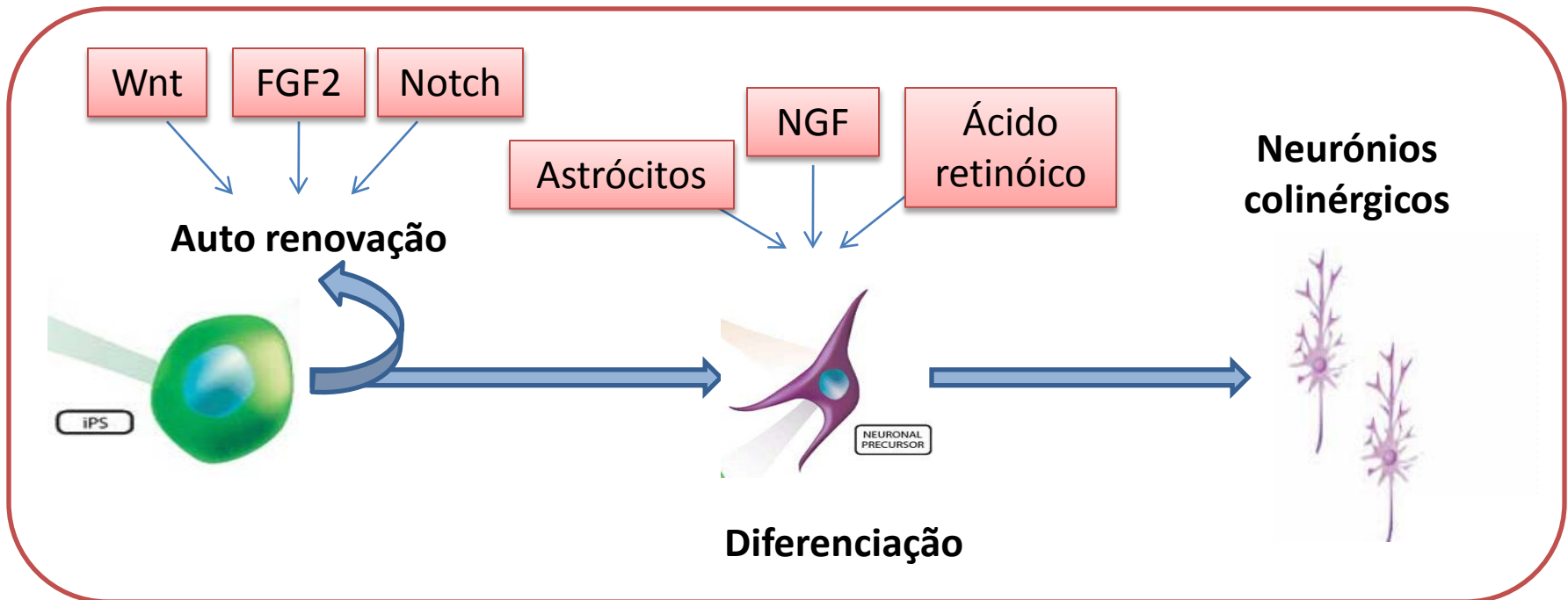
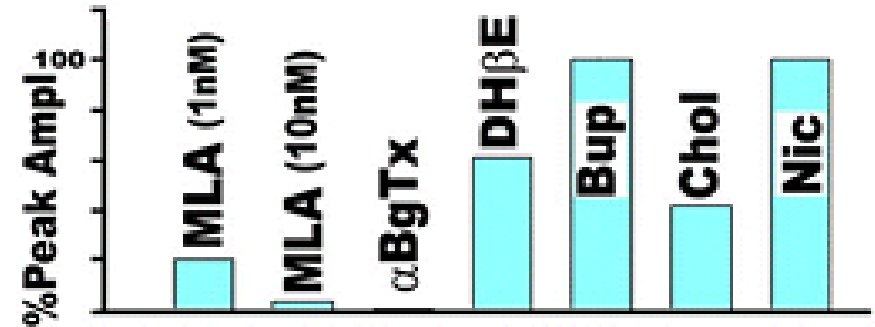


- Detectar a existência de ligações neuronais pré-existentes;
- Meio com astrócitos;
- IPSCs espontâneas (CNQX e D-AP5);
- IPSCs evocados (picrotoxina);
- EPSCs evocados e espontâneos.

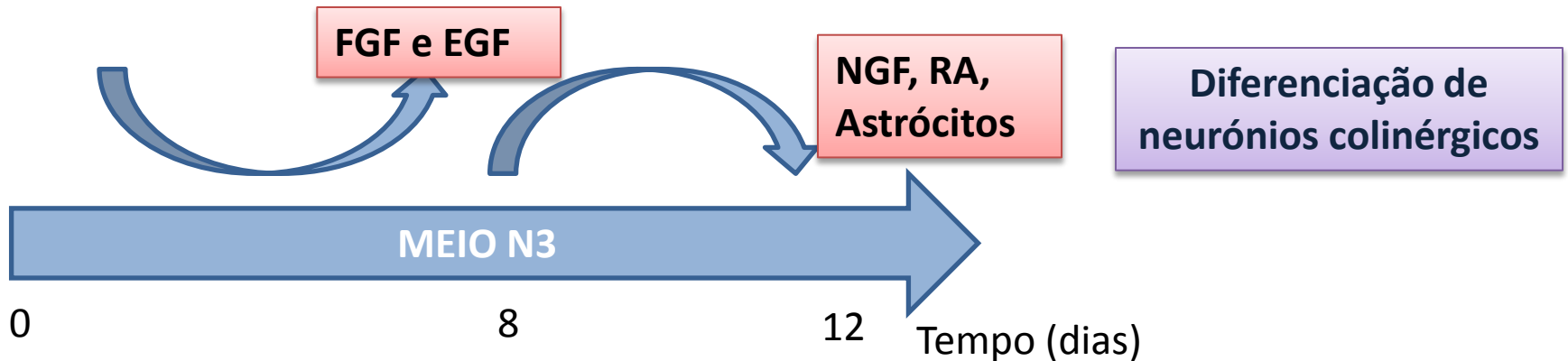
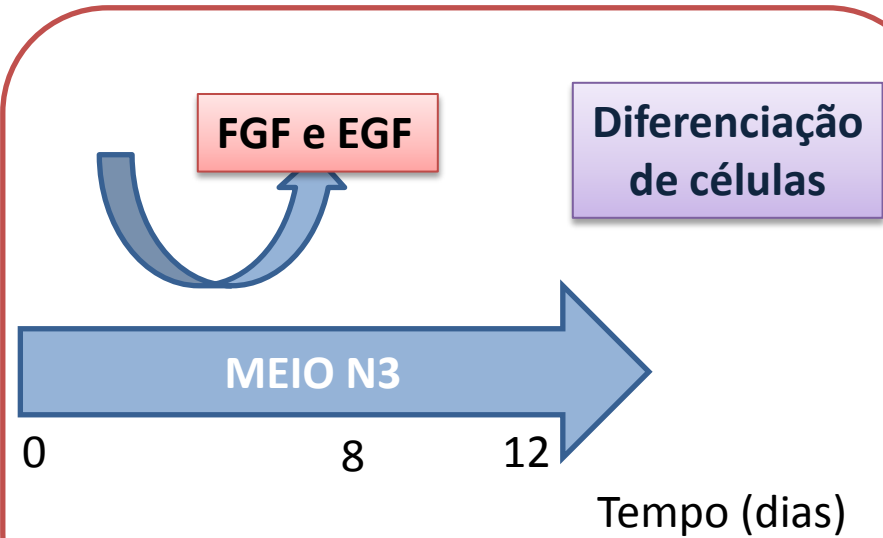
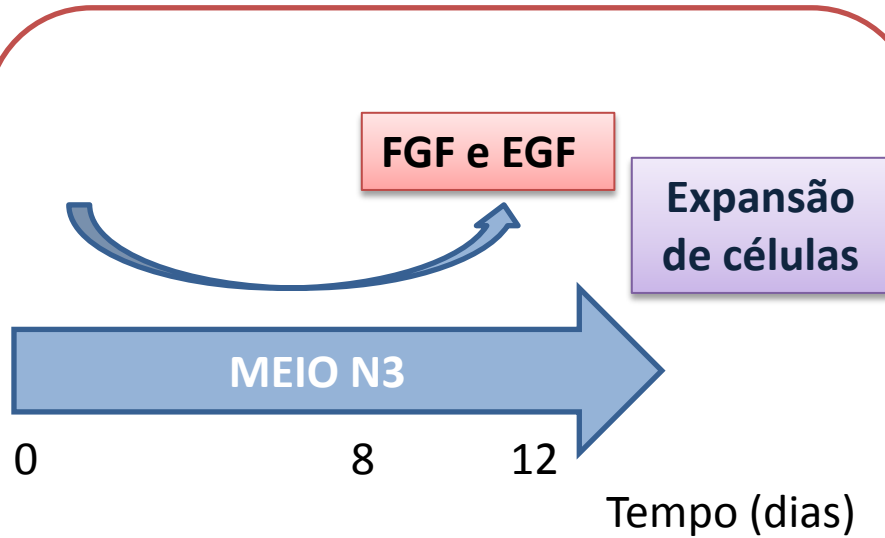
# Metodologia – Diferenciação neuronal

## Diferenciação e detecção de neurónios colinérgicos:

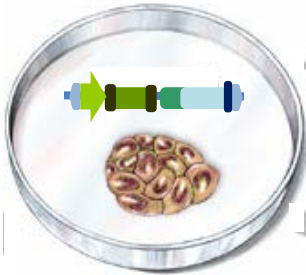
- Anticorpo anti acetilcolinesterase;
- Detecção de correntes sinápticas.



# Metodologia – Diferenciação neuronal

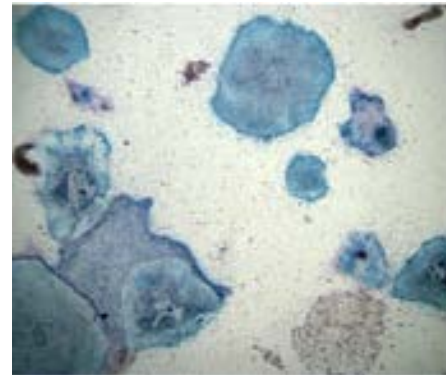


# Resultados esperados – indução de pluripotência



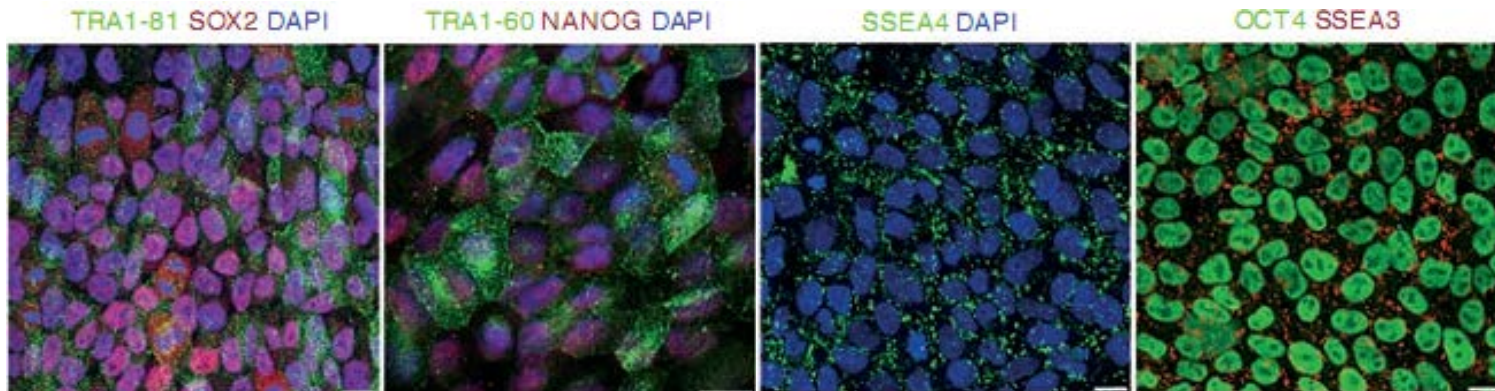
Houve indução de pluripotência?

## Actividade Fosfatase Alcalina



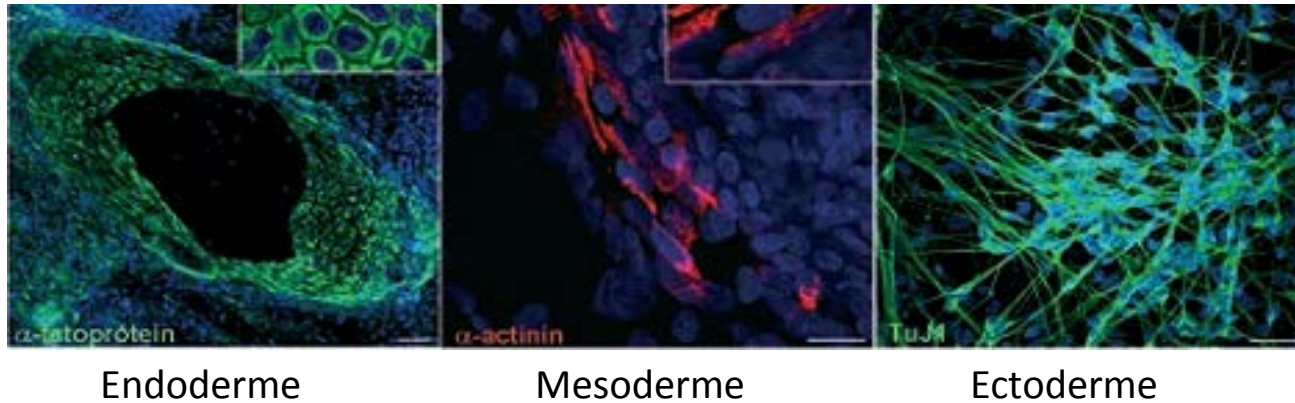
## Imunofluorescência

- TRA-1-60, TRA-1-81
- SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4
- Oct4, Sox2
- NANOG
- Rex-1



# Resultados esperados – indução de pluripotência

## Diferenciação nas três linhas germinativas



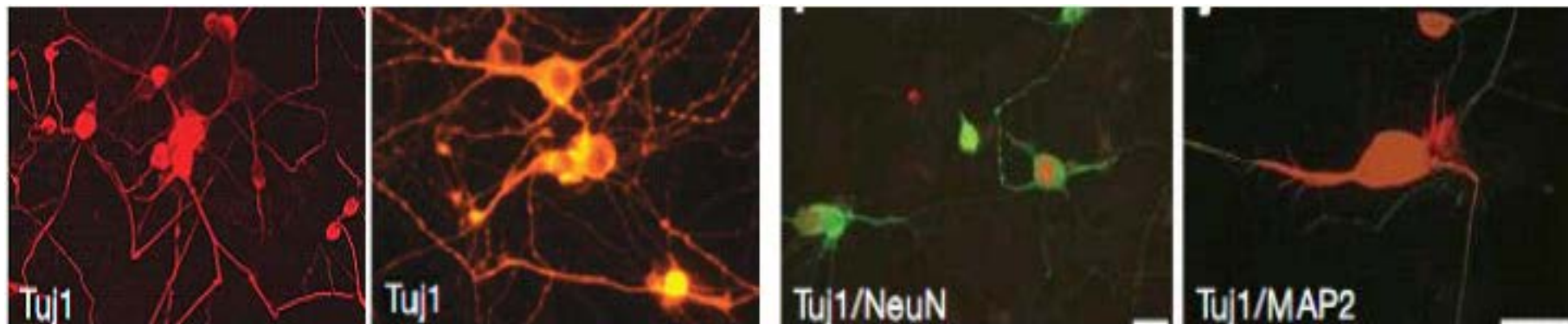
## PCR



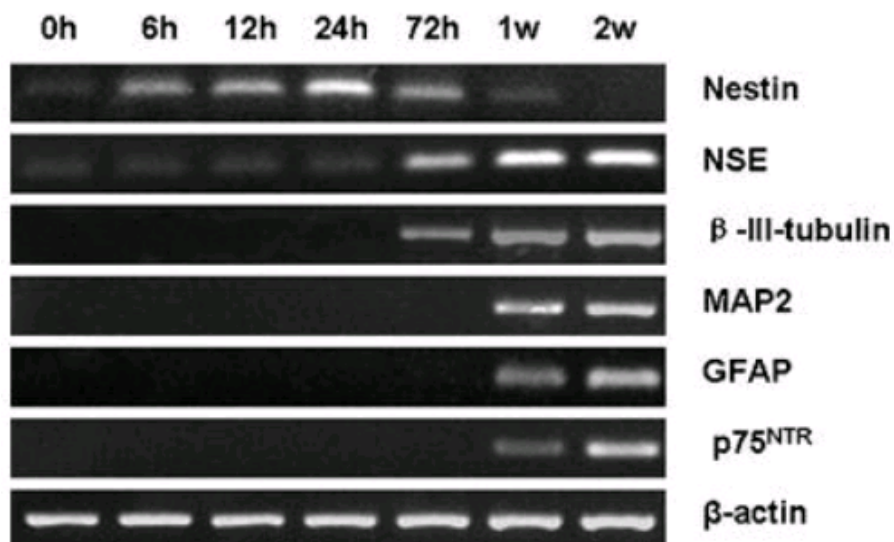
Eficiência de Reprogramação:  $\approx 1\%$

# Resultados esperados – diferenciação neuronal

## Detecção e expressão de Marcadores de Diferenciação Neuronal:



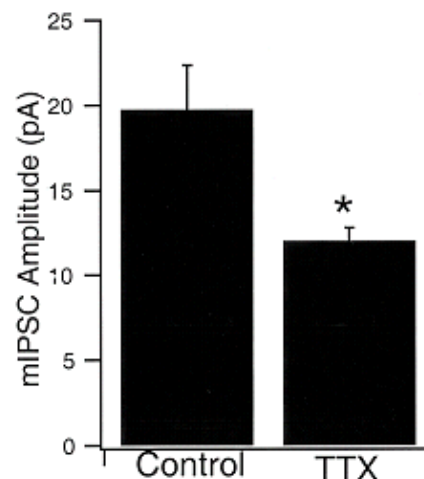
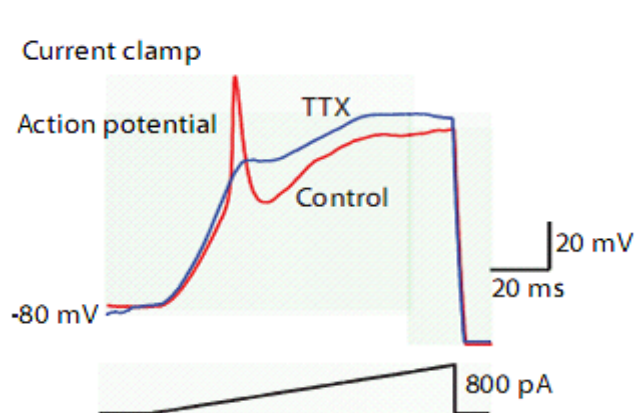
Vierbuchen *et al*, 2010



Ni *et al*, 2010

# Resultados esperados – diferenciação neuronal

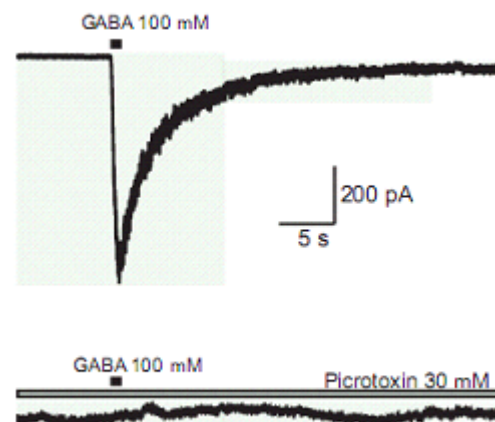
## Caracterização das células com características neuronais:



Bloqueio de correntes mIPSCs com tetrodotoxina

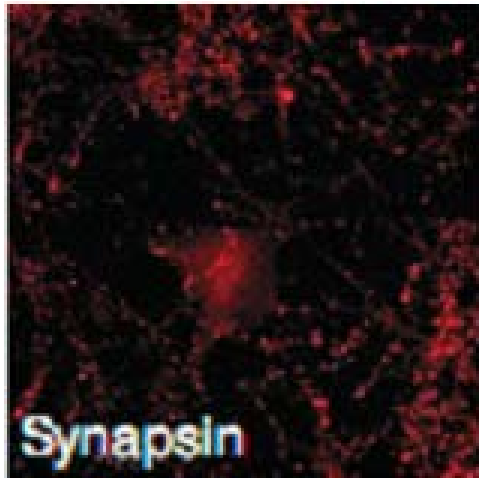
## Existência de canais funcionais dependentes de ligandos

Bloqueio de correntes através de picrotoxina, presença de canais receptores de GABA

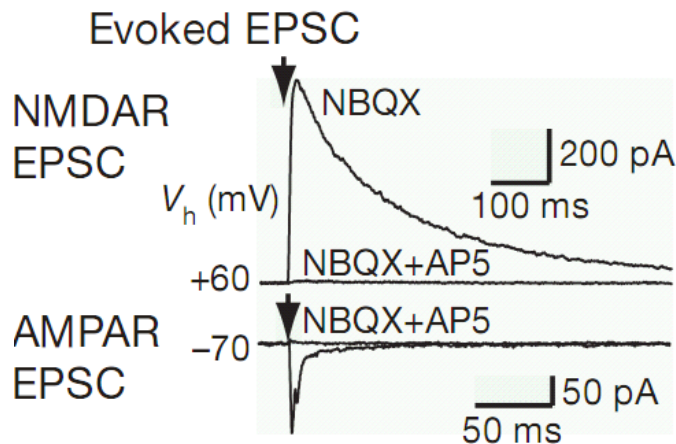
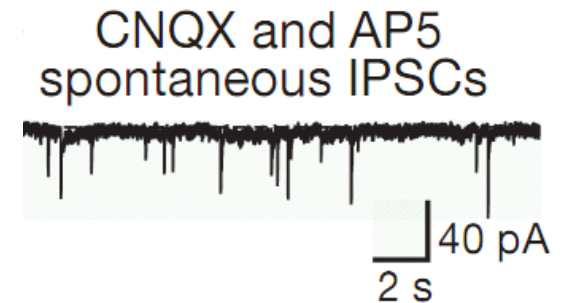
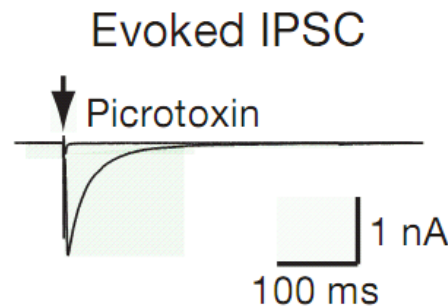


# Resultados esperados – diferenciação neuronal

## Detecção e funcionalidade de sinapses:



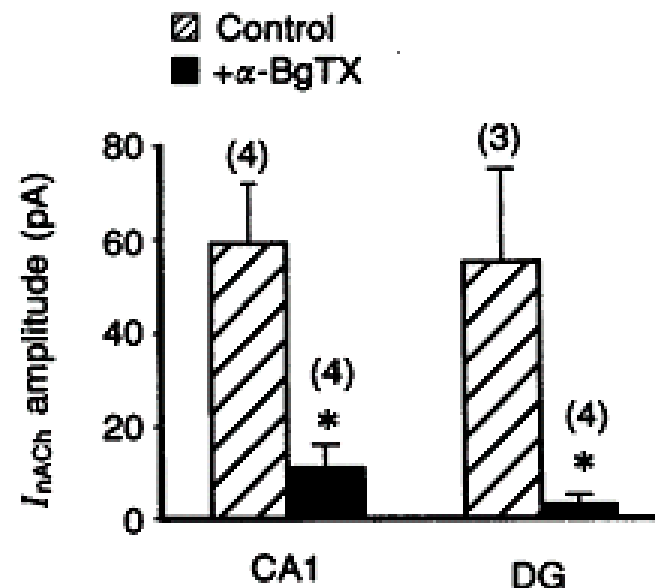
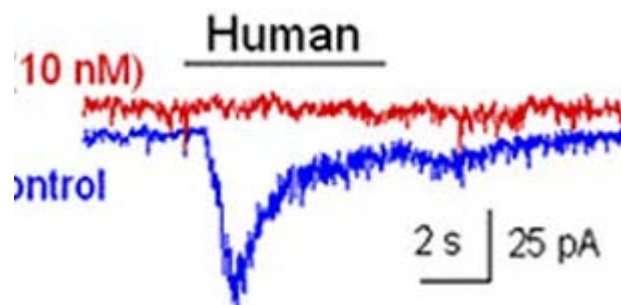
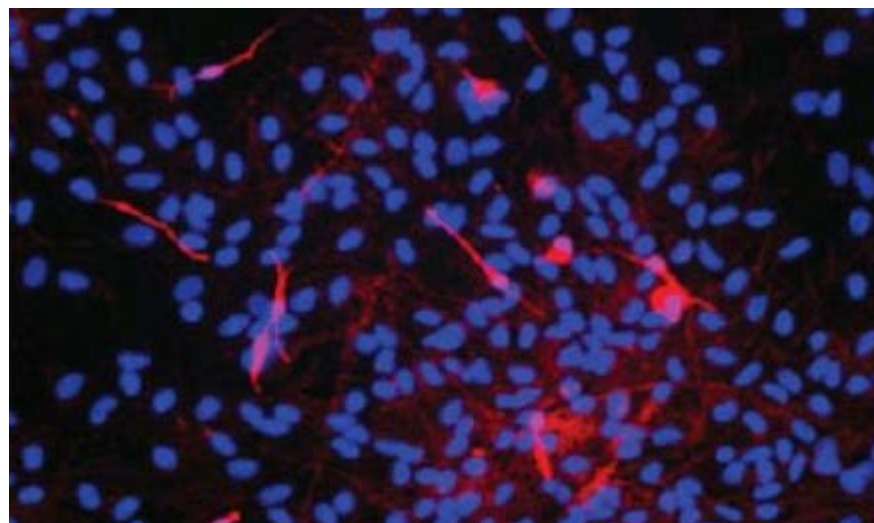
Ligações neuronais pré-existentes  
Actividade dos receptores NMDA e AMPA



Ligações neuronais entre si  
Actividade dos receptores NMDA e AMPA

# Resultados esperados – diferenciação neuronal

Detecção e funcionalidade de neurónios colinérgicos:



Bloqueio de receptores de acetilcolina por  $\alpha$ -bungarotoxina

# Resultados esperados – linhas celulares reprogramadas

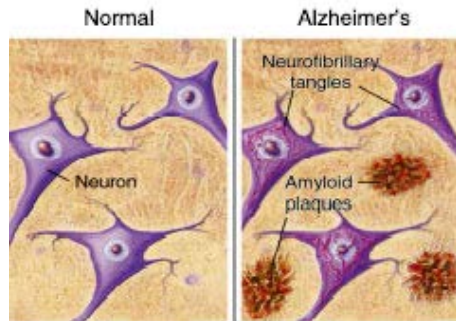
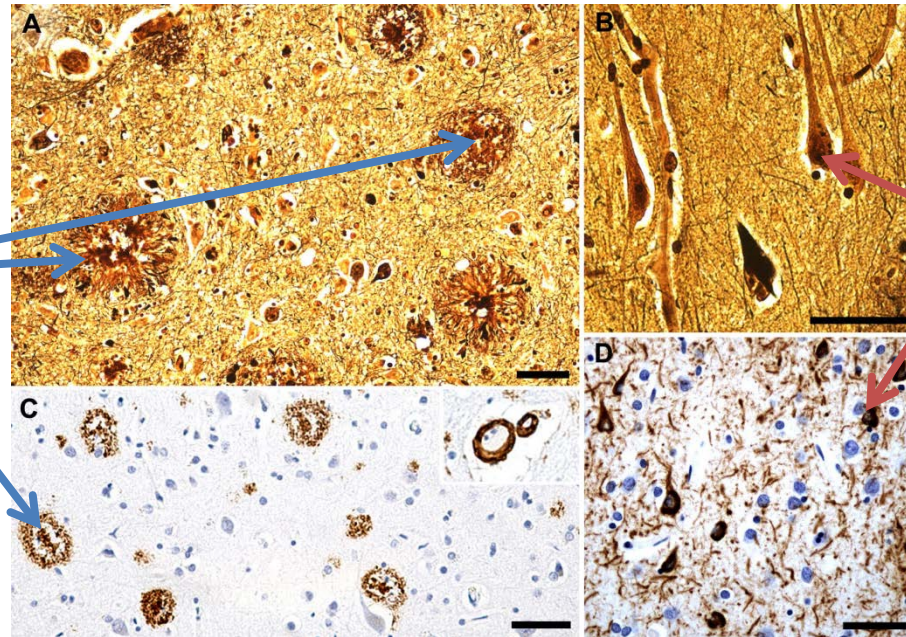


Fig.10

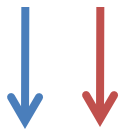
Placas de A $\beta$



NFTs

Fig. 10 Tecido nervoso com placas de amilóide- $\beta$  e NFTs.

**Nas culturas com gene substituído:**



Acumulações de amilóide- $\beta$  e consequente hiperfosforilação de Tau, bem como de outros tipos de processos como inflamação e ROS

# Conclusões e perspectivas

- Necessária otimização;
- Baixas taxas de sucesso;
- Células iPS possuem um tempo de vida definido;
- Células somáticas não igualmente passíveis de ser induzidas à pluripotência;
- Técnicas dispendiosas, morosas e difíceis de executar.

**Reprogramação e  
Diferenciação Celular**



- Estudo de doenças
- Terapia



© The Pittsburgh Post-Gazette. Dist. by UFS Inc.

# Referências bibliográficas

## Imagens adaptadas de:

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., Edel, M., Boué, S. e Belmonte, J.C.I. (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature Biotechnology*, 26: 1276-1284. doi: 10.1038/nbt.1503.
- LaFerla, F.M.; Green, K.N. e Oddo, S. (2007) Intracellular amyloid-in Alzheimer's disease, *Nature*, 8: 499-509. doi:10.1038/nrn2168.
- LaFerla, F. (2008) Amyloid- $\beta$  and tau in Alzheimer's disease, Ed: Katherine Whalley, Nature Publishing Group, <http://www.nature.com/nrn/posters/index.html>
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H. e Nagy, A. (2009) piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 458: 766-770. doi: 10.1038/nature07863.  
<http://www.nature.com/nbt/journal/v20/n5/images/nbt0502-445-F1.gif>
- [http://newsimg.bbc.co.uk/media/images/44251000/gif/44251016\\_stem\\_cells\\_416.gif](http://newsimg.bbc.co.uk/media/images/44251000/gif/44251016_stem_cells_416.gif)
- <http://www.scq.ubc.ca/wp-content/dna.gif>
- [http://www2.natura.net/web/br/hotsite/chronos/IMG/GLOSSARIO/imgGlossarioLetraQ\\_01.jpg](http://www2.natura.net/web/br/hotsite/chronos/IMG/GLOSSARIO/imgGlossarioLetraQ_01.jpg)
- <http://www.web-books.com/eLibrary/ON/B0/B3/03MAmyloid.html>
- <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/36/Amyloid-beta.png>
- <http://www.alzcareblog.com/tag/beta-amyloid/>