

MEMÓRIA DESCRITIVA  
DA  
PATENTE DE INVENÇÃO  
No 95 152

NOME: MAX PLANCK INSTITUT FUR PSYCHIATRIE e REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

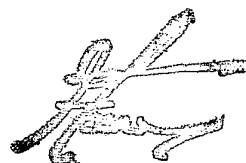
EPÍGRAFE: "Processo de produção de factor neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), dos meios para o mesmo e de composições farmacêuticas"

INVENTORES: Carolyn Hyman, Ralph Alderson, George Yancopoulos, Ronald M. Lindsay, Yves-Alain Barde, Hans Friedrich Erwin Thoenen, Andreas Hohn, Friedrich Lottspeich, Magdalena Hofer, Joachim Leibrock, Bastian Hengerer, Dan Lindholm, Francisco Zafra e David Edgar

Reivindicação do direito de prioridade (ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883):

Estados Unidos da América em 30 de Agosto de 1989 sob o nº. 07/400.591 e em 20 de Agosto de 1990 sob o nº. 07/570 657.

71 493  
6526-019-118



PATENTE Nº. 95 152

"Processo de produção de factor neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), dos meios para o mesmo e de composições farmacêuticas"

para que

MAX PLANCK INSTITUT FUR PSYCHIATRIE e RE-GENERON PHARMACEUTICALS, INC., pretendem obter privilégio de invenção em Portugal.

#### R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de obtenção de sequências de ácidos nucleicos codificando factor neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), bem como a proteínas de BDNF produzidas quantitativamente usando estas sequências de ácidos nucleicos, bem como seus fragmentos e derivados. O invento refere-se ainda ao processo de preparação de composições farmacêuticas. O invento refere-se também ao processo de obtenção de anticorpos dirigidos a BDNF ou seus fragmentos. Permitindo uma comparação entre as sequências de ácido nucleico de BDNF e NGF, o presente invento proporciona a identificação de regiões homólogas de sequências de ácidos nucleicos entre BDNF e NGF, definindo assim uma família de genes BDNF/NGF; o invento refere-se a um processo para a identificação e isolamento de membros adicionais desta família de genes.



## MEMÓRIA DESCRITIVA

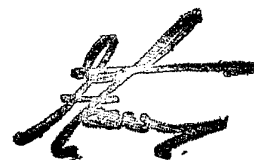
### 1. INTRODUÇÃO

O presente invento refere-se a sequências de ácidos nucleicos que codificam o factor neurotrófico derivado do cérebro, a proteínas, fragmentos peptídicos ou derivados, substancialmente puros, produzidos em quantidade a partir daquele, e a anticorpos dirigidos contra a proteína, fragmentos peptídicos ou derivados do BDNF. Além disso, o invento refere-se a genes que são membros de uma família de genes, BDNF/NGF, recentemente definida, e aos produtos dos seus genes. O invento também descreve a preparação de composições farmacêuticas que incluam quantidades efectivas de produtos de genes do BDNF ou, em alternativa, anticorpos dirigidos contra os produtos de genes do BDNF, e ainda métodos de diagnóstico e de tratamento de várias doenças e distúrbios neurológicos, incluindo a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson. Em particular, os produtos de genes do BDNF do invento têm valor no diagnóstico e terapia de distúrbios dos neurónios dopaminérgicos, como na doença de Parkinson, bem como os distúrbios dos neurónios sensitivos e as doenças degenerativas da retina.

### 2. ANTECEDENTES DO INVENTO

#### 2.1. A MORTE DAS CÉLULAS NEURONAIS E O PAPEL DOS FACTORES NEUOTRÓFICOS NO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO

Em muitas partes do sistema nervoso dos vertebrados estão presentes muitos mais neurónios no início do desenvolvimento do que no animal adulto. Os períodos iniciais do desenvolvimento caracterizam-se por ondas de morte natural das células neuronais (Carr and Simpson, 1978, J. Comp. Neurol., 182:727-740; Cowan et al., 1984, Science 225:1258-1265). A sobrevivência, diferenciação e a maturação dos neurónios em desenvolvimento podem ser reguladas por factores ambientais ou epigenéticos, mais do que por um programa genético intrínseco rigoroso. Por exemplo, manipulações experimentais do embrião do pinto mostraram, que a transplantação ou extirpação de "campos-alvo" periféricos, como a gema de membros ou o olho nas fases iniciais de desenvolvimento do pinto, podem ter como resultado um acréscimo ou decréscimo



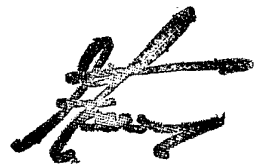
-3-

correspondentes, respectivamente, do número de neurónios sensitivos, simpáticos, parassimpáticos ou motores, adjacentes ao "campo-alvo" aumentado ou reduzido (Hamburger, 1934, J. Exp. Zool. 68:449; Hollyday and Hamburger, 1976, J. Comp. Neurol., 170:311-321; Landmesser and Pilar, 1976, J. Cell. Biol., 68:357-374). Um campo-alvo pode apenas suportar um número limitado de neurónios, e uma fase normal do processo de desenvolvimento pode ser a supressão de um número excessivo de neurónios para simular a capacidade neurotrófica do tecido-alvo. A descoberta e isolamento da proteína agora chamada factor de crescimento do nervo (NGF=Nerve Growth Factor) conduziu a uma hipótese molecular de como um alvo pode ser capaz de regular o número de neurónios que sobrevivem e inervam esse tecido (Levi-Montalcini et al., 1968, Physiol Rev., 48:524-569; Thoenen and Barde, 1980, Physiol Rev., 60:1284-1335).

Está agora bem assente que, pelo menos no sistema nervoso periférico, esses tecidos-alvo neuronais sintetizam e libertam quantidades limitadas de várias moléculas neurotróficas que são críticas para a sobrevivência de tipos específicos de neurónios (Korsching and Thoenen, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:3513-3516; Heumann et al., 1984, EMBO J. 3:3183-3189; Shelton and Reichardt, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:7051-7955; Korsching and Thoenen, 1985, Neurosci. Lett. 54:201-205).

## 2.2. FACTOR DE CRESCIMENTO DO NERVO

O factor de crescimento do nervo (NGF) é de longe a mais completamente caracterizada destas moléculas neurotróficas e tem-se demonstrado, tanto in vitro como in vivo, ser essencial para a sobrevivência de neurónios simpáticos e sensitivos derivados da crista neural durante a primeira fase do desenvolvimento tanto do pinto como do rato (Levi-Montalcini and Angeletti, 1963, Develop. Biol. 7:653-659; Levi-Montalcini et al., 1968, Physiol. Rev. 48:524-569). Verificou-se que injeções de NGF purificado no embrião em desenvolvimento do pinto causam hiperplasia maciça e hipertrofia dos neurónios sensitivos espinais e dos neurónios simpáticos (Levi-Montalcini and Booker, 1960, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 46:373-384; Hamburger et al.,



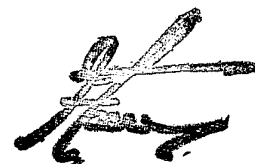
1981, J. Neurosci. 1:60-71). Inversamente, a remoção ou sequestração de NGF endógeno por injeção diária de anticorpos anti-NGF em ratos neo-natais tem sido associada com a destruição virtual do sistema nervoso simpático (Levi-Montalcini and Booker, 1960, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 46:384-391; Levi-Montalcini and Agnietti, 1966, Pharmacol. Rev. 18:619-628). A exposição aos anticorpos do NGF, mesmo efectuada mais cedo no desenvolvimento por injeções de anticorpos in utero ou por transferência transplacentária passiva de anticorpos maternos tem resultado numa perda substancial de neurónios sensitivos derivados da crista neural, tais como os neurónios sensitivos espinais e dorso médio trigeminais (Goedert et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:1580-1584; Gorin and Johnson, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:5382-5386). Até recentemente, quase todos os estudos sobre o NGF têm focado o seu papel no sistema nervoso periférico, mas parece agora que o NGF também influencia o desenvolvimento e manutenção de populações específicas de neurónios no sistema nervoso central (Thoenen et al., 1987, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 109:145-178; Whittemore and Seiger, 1987, Brain Res. Rev. 12:439-464).

A descoberta accidental de grandes quantidades de proteína do NGF na glândula submandibular do ratinho macho adulto (Cohen, 1960, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 46:302-311) e uma descoberta anterior de elevados níveis de NGF em veneno de cobra (Cohen and Levi-Montalcini, 1956, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 42:571-574), forneceram, fortuitamente, quantidades suficientes de NGF para permitir estudos relativos à fisiologia, à química da proteína e, mais recentemente, à biologia molecular do NGF (isto é, a clonação molecular do NGF e do seu receptor). A função das grandes quantidades de NGF na glândula salivar do ratinho macho adulto, permanece desconhecida; parece contudo que esta abundante fonte de NGF poderá não desempenhar qualquer papel no desenvolvimento ou manutenção do sistema nervoso central ou periférico. Em tecidos-alvo inervados por neurónios sensíveis ao NGF (neurónios que mostraram depender do NGF para sobreviver, que possuem elevada afinidade aos receptores de NGF e que, com elevada

especificidade, internam e transportam para trás o NGF) verificou-se que no estado estabilizado os níveis mensuráveis de NGF eram extremamente baixos, da ordem dos picogramas ou nanogramas por grama de tecido, quando comparados com os níveis mil vezes mais elevados no tecido da glândula salivar do ratinho macho adulto. Não se encontrou o NGF, em qualquer nível apreciável, no soro e portanto não parece ser uma hormona ou um factor de crescimento na circulação (Suda et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:4042-4046).

Além da importante descoberta de uma grande fonte de proteína do NGF na glândula submandibular do ratinho o progresso de ensaios biológicos sensíveis, de confiança e eficientes tem desempenhado um papel importante na elucidação da biologia e bioquímica do NGF. Os gânglios da raiz dorsal (DRG) do embrião de pinto em desenvolvimento são um dos primeiros tipos neuronais a revelarem-se sensíveis in vitro ao NGF. Explantes de culturas de DRG do pinto E8-E12 num coágulo de plasma e, mais recentemente, culturas de DRG do pinto enriquecidas em neurónios dissociados provaram ser muito úteis em bioavaliações da actividade do NGF (p. ex. durante a purificação) e em estudos in vitro da biologia do NGF (Levi-Montalcini et al., 1954, Cancer Res. 4:49-57; Levi-Montalcini and Angeletti, 1963, Develop. Biol. 1:653-659; Greene, 1977, Develop. Biol. 58:96, ibid 58:106). O facto de mais de quarenta DRG poderem ser dissecados de um único embrião de pinto levou ao uso muito difundido das bioavaliações do NGF em muitos laboratórios.

Além da disponibilidade de grandes quantidades de proteína do NGF e de eficientes sistemas de avaliação do NGF, um terceiro factor importante que muito contribui para o conhecimento da biologia do NGF é a relativa facilidade com que se podem obter anticorpos do NGF em cobaias, coelhos, ovelhas, etc.; parece que o NGF do ratinho é altamente imunogénico. Cohen (1960, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 46:302-311) criou anticorpos ao NGF que tinha purificado da glândula submandibular do ratinho e mostrou, com Levi-Montalcini e Booker (1960, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 46:384-391) que estes anticorpos destruíam os gânglios simpáticos



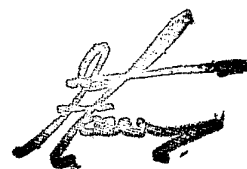
ou causavam "imunossimpaticotomia" quando administrados diariamente a ratos recém-nascidos (Levi-Montalcini and Angeletti, 1966, Pharmacol. Rev. 18:619-628).

A abundância de proteína do NGF permitiu determinar a sequência principal, por química de proteínas relativamente convencional (Angeletti and Bradshaw, 1971, Proc. Natl. Acad. Sci. 68:2417-2420). O gene do NGF foi agora clonado em várias espécies incluindo o ratinho (Scott et al., 1983, Nature 302:538-540), o homem (Ullrich et al., 1983, Nature 303:821-825) a vaca e o pinto (Meier et al., 1986, EMBO J. 5:1489-1493) e o rato (Whittemore et al., 1988, J. Neurosci. Res., 20:402-410) usando biologia molecular essencialmente convencional baseada na disponibilidade da sequência da proteína do NGF do ratinho para preparar sondas adequadas de oligonucleótidos. A disponibilidade de NGF abundante facilitou também muito os estudos sobre o receptor do NGF, que por fim conduziram à clonagem molecular do receptor de NGF do homem e do rato (Johnson et al., 1986, Cell, 47:545-554; Radeke et al., 1987, Nature 325:593-597).

Está agora bem demonstrado que o NGF não é um factor neurotrófico ubíquo. Dentro do sistema nervoso periférico, o NGF parece não ser um factor de sobrevivência dos neurónios parassimpáticos, neurónios sensitivos derivados de placodos neurais ou neurónios entéricos, segundo se determinou em estudos in vitro e in vivo. Além disso o NGF parece não ser um factor de sobrevivência para neurónios motores, em desenvolvimento (Oppenheim, 1982, J. Comp. Neurol. 210:174-189), ainda que estes neurónios pareçam expressar pelo menos uma reduzida forma de afinidade do receptor de NGF durante o desenvolvimento (Raivich et al., 1985, EMBO J. 4:637-644). A ausência de efeito do NGF sobre estes tipos neuronais estimulou a pesquisa de outros factores neurotróficos, especialmente de factores que apoiariam a sobrevivência dos neurónios motores da medula espinal e/ou os neurónios parassimpáticos do gânglio ciliar.

### 2.3. OUTROS FACTORES NEUROTROFICOS

Na década passada houve numerosos relatórios sobre a



actividade neurotrófica em extractos de uma grande variedade de tecidos e em meios de cultura condicionados de tipos de células muito diferentes. Em quase todos os casos, contudo, os progressos na purificação e caracterização destas actividades têm esbarrado no facto destas actividades estarem presentes em quantidades extremamente pequenas, da ordem dos picogramas a nanogramas por grama de tecido.

Além disso, ainda que tenham sido estabelecidos ensaios biológicos adequados para os neurónios periféricos, a proposta de ensaios de confiança, reprodutíveis e específicos para o sistema nervoso central tem mostrado ser problemática. Enquanto que os tipos individuais de neurónios periféricos se mostram como gânglios discretos, facilmente dissecáveis, os neurónios do sistema nervoso central (SNC) são, invariavelmente, altamente heterogêneos na sua distribuição. São assim necessários marcadores específicos quer para a identificação quer para o melhoramento de determinadas classes de neurónios do SNC. Tem sido muito limitado o progresso na produção destes marcadores, p. ex., de anticorpos dirigidos para a superfície da célula ou componentes cito-esqueléticos ou de estirpes histológicas específicas. Deste modo, a caracterização de factores neurotróficos que sejam (i) não tão abundantes como o NGF, (ii) difíceis na sua avaliação e (iii) não disponíveis em quantidades suficientes para eliciar a produção de anticorpos, provou ser um processo extremamente difícil.

#### 2.3.1. COMPARAÇÃO DO FACTOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DO CÉREBRO, COM O FACTOR DE CRESCIMENTO DOS NERVOS

A actividade neurotrófica capaz de manter a sobrevivência de neurónios de gânglios da raiz dorsal de embriões de pintos, in vitro, foi identificada no "meio condicionado" onde se tinham cultivado células de glioma C-6 do rato (Barde et al., 1978, Nature 274:818). A actividade não foi neutralizada por anticorpos do NGF do rato, o que sugere a presença de um outro factor neurotrófico no meio condicionado. Actividades semelhantes que não podem ser bloqueadas por anticorpos do NGF foram depois reveladas em culturas de células astrogliais do cérebro do rato



adulto normal (Lindsay, 1979, *Nature*, 282:80-82; Lindsay et al., 1982, *Brain Res.* 243:329-343) e nos extractos do cérebro do rato adulto e do rato em crescimento (Barde et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1199-1203) e da medula espinal do pinto maduro ou em desenvolvimento (Lindsay and Peters, 1984, *Neurosci.*, 12:45-51). No entanto, em caso nenhum foi factor activo isolado ou identificado e permanece questionável saber até que ponto as actividades observadas foram devidas ao mesmo factor ou a factores diferentes.

Usando o cérebro de porco como material inicial, Barde et al. (1982, *EMBO J.* 1:549-553) mencionaram um factor, agora denominado factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que parece melhorar a sobrevivência dos neurónios dos gânglios da raiz dorsal em embriões de pintos E10/E11. Verificou-se que a actividade neurotrófica residia numa proteína altamente básica (ponto isoeléctrico,  $pI > 10,1$ ) que migrava, durante a electroforese de gel com dodecilsulfato de sódio (SDS), como uma única banda de peso molecular 12,3 kD. O factor de purificação foi estimado em  $1,4 \times 10^6$  mas o rendimento foi muito baixo, com apenas aproximadamente 1  $\mu$ g de BDNF purificado a partir de 1,5 kg de cérebro de porco. Além disso, como o último passo do processo de purificação foi a electroforese preparativa em gel, a actividade do BDNF não poderia ser completamente restabelecida devido à presença de SDS residual (Barde e Thoenen, 1985, em "*Hormones and Cell Regulation*", Vol. 9, Dumont et al., eds. Elsevier Science Publishers, pp. 385-390). Fazia-se notar que a natureza altamente básica e o tamanho molecular do BDNF eram muito semelhantes às do monómero NGF. O BDNF parecia contudo ter propriedades que diferiam das propriedades já conhecidas do NGF pois que (a) na avaliação dos gânglios da raiz dorsal do pinto, os anticorpos do NGF não tinham efeito aparente sobre a actividade biológica do BDNF; (b) os efeitos do BDNF e NGF pareciam ser aditivos; e (c) ao contrário de NGF, verificou-se que o BDNF não tinha qualquer efeito sobre a sobrevivência dos neurónios simpáticos do pinto E12. Além disso, durante os primeiros estudos com extractos de



cérebro, observou-se que a actividade neurotrófica nestas fontes parecia actuar sobre os neurónios sensitivos em estágios de desenvolvimento mais tardios do que quando associada ao NGF. Usando culturas separadas de neurónios de embriões de pintos cultivados num substrato policationico como a polilisina ou a poliornitina, verificou-se que o BDNF suportava a sobrevivência de mais de 30% dos neurónios dos gânglios da raiz dorsal de embriões de pintos E10-11 (dia embrionário dez ou onze) mas parecia ter pouco efeito na sobrevivência dos mesmos neurónios em E6 (Barde et al., 1980. Proc. Natl. Acad. USA 77:1199-1203 supra). Em condições semelhantes, o NGF suportou a sobrevivência de 30-40% dos neurónios DRG (dorsal root ganglion) em E6. É interessante notar que mais tarde se verificou que, quando cultivados num substrato revestido com a matriz extracelular de glicoproteína laminina, tanto o NGF como o BDNF suportaram a sobrevivência de cerca de 50% de neurónios de DRG de embriões de pintos de idades E6-E12 (Lindsay et al., 1985, Develop. Biol. 112:319-328). Em estudos posteriores verificou-se que os efeitos do NGF e BDNF eram aditivos quando ambos estavam presentes em concentrações de saturação.

Estudos anteriores de Levi-Montalcini (1966, The Harvey Lectures 60:217-259) sobre a especificidade neuronal do NGF, sugeriam que o NGF não era um factor neurotrófico ubiquo mesmo para os neurónios sensitivos, pois que o NGF parece não ter efeito sobre neurónios de certos gânglios sensitivos do crânio dos pintos, especialmente o gânglio nodoso do décimo nervo craniano. Estudos posteriores, in vivo (Johnson et al., 1980, Science 210:916-918; Pearson et al., 1983 Develop. Biol. 96:32-3) mostraram que a exclusão de NGF durante a embriogénese não tinha qualquer efeito na sobrevivência dos neurónios da maior parte dos gânglios sensitivos cranianos do rato, enquanto que um tratamento semelhante fazia baixar a contagem neuronal em gânglios sensitivos derivados da crista neural. Estudos mais detalhados in vitro (Lindsay e Rohrer, 1985, Develop. Biol. 112:30-48; Davies e Lindsay, 1985, Develop. Biol. 111:62-72; Lindsay et al., 1985, J. Cell. Sci. Suppl. 3:115-129) mostraram



claramente que o NGF suportava a sobrevivência da maior parte dos neurónios sensitivos derivados da crista neural mas que não tinha efeito aparente na sobrevivência de neurónios sensitivos cranianos derivados de placodos (placodes) neurais.

A primeira demonstração de uma especificidade neuronal do BDNF distinta da do NGF foi a demonstração in vivo de que o BDNF purificado suporta a sobrevivência de 40-50% dos neurónios sensitivos separados do gânglio nodoso derivado do placodo neural do embrião de pinto em E6, E9 ou E12 (Lindsay et al., 1985, J. Cell Sci. Supp. 3:115-129). NGF não tinha efeito aparente sobre estes neurónios quer por si próprio quer em conjunção com BDNF. Mostrou-se mais tarde em estudos de culturas de explantes que o BDNF parecia suportar a sobrevivência e desenvolvimento de neurite de outros gânglios sensitivos derivados de placodos neurais, incluindo os gânglios do rochedo (petroso), geniculado, ventrolateral do trigémeo (Davies et al., 1986, J. Neurosci. 6:1897-1904), nenhum dos quais se tinha mostrado sensível ao NGF. Em todos os estudos acima referidos, os anticorpos do NGF não tinham qualquer efeito sobre a actividade observada do BDNF. Além do seu efeito sobre os neurónios cultivados provenientes de gânglios periféricos, verificou-se que o BDNF estimula a sobrevivência e a diferenciação neuronal de células cultivadas da crista neural da codorniz (Kalcheim e Gendreau, 1988, Develop. Brain. Res. 41:79-86).

Antes do presente invento, a incapacidade de produzir quantidades suficientes de BDNF para imunização impediu a produção de anticorpos anti-BDNF para comparação com anticorpos anti-NGF quanto aos seus efeitos sobre as populações neuronais e impossibilitou experiências de neutralização cruzada BDNF/NGF. Dois estudos recentes com BDNF (Kalcheim et al., 1987, EMBO J. 6:2871-2873; Hofer e Barde, 1988, Nature 331:261-262) indicaram contudo um papel fisiológico do BDNF no desenvolvimento do SNP em aves. Se se colocar uma barreira mecânica in ovo entre os DRG em E3/E4 (gânglios da raiz dorsal de embriões de 3 ou 4 dias) e o seu alvo SNC no tubo neural, observa-se que muitos neurónios dos DRG morrem (Kalcheim e Le Douarin, 1986, Develop. Biol. 116:451-466). Postulou-se que esta morte neuronal podia ser devida à

perda de um factor neurotrófico derivado do SNC (tubo neural). Observou-se depois que o BDNF, ligado a uma membrana sialástica revestida com laminina, podia evitar esta morte de células (Kalcheim et al., 1987, EMBO J. 6:2871-2873). Verificou-se que injeções de BDNF em ovos em desenvolvimento de codorniz reduzem a morte de células que ocorria naturalmente nos gânglios nodosos, efeito este ainda não observado com o NGF (Hofer e Barde, 1988, Nature, 331:261-262). Além do seu efeito sobre os neurónios sensitivos periféricos tanto da crista neural como nos de origem de placodo neural, o BDNF mostrou suportar a sobrevivência de neurónios do SNC em desenvolvimento. Johnson et al. (1986, J. Neurosci., 6:3031-3938) apresentaram dados indicando que a BDNF suporta a sobrevivência de células do gânglio retiniano, cultivados, de embriões do rato E17. Isto confirmou os estudos anteriores que mostravam que os meios condicionados e os extractos de cérebro preparados a partir das células do gânglio retinal de certas regiões, pareciam suportar a sobrevivência destes neurónios (McCaffery et al., 1982, Ex. Brain Res. 48:37-386; Sarthy et al., 1983, J. Neurosci. 3:2532-2544; Turner et al., 1983, Dev. Brain Res. 6:77-83).

Além dos efeitos sobre a sobrevivência de neurónios em desenvolvimento, em cultura, o BDNF mostrou ter efeitos sobre neurónios de cultura do sistema nervoso periférico e central dos adultos. Verificou-se que o BDNF, bem como o NGF, estimulam a regeneração axonal de neurónios, em cultura, dos DRG do rato adulto (Lindsay, 1988, J. Neurosci. 8:2394-2405) ainda que os neurónios sensitivos do adulto não pareçam necessitar<sup>de</sup> factores neurotróficos para manutenção in vitro por 3 ou 4 semanas. Além disso, em culturas da retina do rato adulto, observou-se que o BDNF melhorava tanto a sobrevivência como a elongação axonal das células do gânglio retinal (Thanos et al., 1989, Eur. J. Neurosci. 1:19-26). No Quadro I apresenta-se a comparação dos efeitos biológicos do NGF e do BDNF.

QUADRO I  
COMPARAÇÃO DAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DO BDNF E NGF\*

| <u>SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO</u> |                                                            | <u>SOBREVIVÊNCIA**</u> |            |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------|------------|
|                                   |                                                            | <u>BDNF</u>            | <u>NGF</u> |
| (i)                               | DRG do pinto E6                                            | -                      | ++         |
|                                   | DRG do pinto E10                                           | -                      | ++         |
|                                   | Neurónios simpáticos do pinto E12                          | -                      | ++         |
| (ii)                              | DRG do pinto E6-E12                                        | ++                     | ++         |
|                                   | Nodose do pinto E6-E12                                     | ++                     | -          |
|                                   | Neurónios simpáticos do pinto E12                          | -                      | ++         |
|                                   | Ciliar do pinto E12                                        | -                      | -          |
|                                   | (Lindsay et al., 1985, <u>supra</u> )                      |                        |            |
| (iii)                             | Pinto E3-E14:                                              |                        |            |
|                                   | Jugular                                                    | + / ++                 | ++         |
|                                   | DM-trigêmeo                                                | + / ++                 | ++         |
|                                   | Rochedo                                                    | + / ++                 | -          |
|                                   | Geniculado                                                 | + / ++                 | -          |
|                                   | VL-trigêmeo                                                | ++                     | -          |
|                                   | Vestibular                                                 | -                      | -          |
|                                   | Mesencefálico                                              | ++                     | -          |
|                                   | (Davies et al., 1986, <u>supra</u> )                       |                        |            |
|                                   | (Barde et al., 1987, Prog. Brain Res., <u>71</u> :185-189) |                        |            |

SISTEMA NERVOSO CENTRAL

|     |                                                          |    |   |
|-----|----------------------------------------------------------|----|---|
| (i) | Células de gânglio retiniano do rato E17                 | ++ | - |
|     | (Johnson et al., 1986, J. Neurosci. <u>6</u> :3031-3038) |    |   |

---

\* por ordem cronológica de datas de publicação; efeitos em testes in vitro

\*\* sem sobrevivência: (-); sobrevivência moderada (+); boa sobrevivência (++)

---



### 2.3.2. ALVOS NEURONAIS DO FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO

Verificou-se que os neurónios sensitivos dos gânglios dos nervos periféricos surgem de qualquer de duas estruturas embriológicas transitórias distintas, nomeadamente a crista neural e as placodos neurais. A crista neural parece dar origem tanto aos neurónios como às células-satélites de gânglios autónomos e de gânglios sensitivos de nervos espinais, isto é, DRG. A contribuição da crista neural e dos placodos neurais para formarem os gânglios sensitivos dos nervos cranianos, tem sido estudada usando o sistema de transplantação quimérica codorniz/pinto, proposto por Le Douarin (Le Douarin, 1973, Develop. Biol. 20:217-222; Noden, 1978, Develop. Biol. 67:313-329; Narayanan e Narayanan, 1980, Anat. Rec. 196:71-82; Ayer-Le Lievre e Le Douarin, 1982, Develop. Biol. 94:291-310; D'Amico-Maratel e Noden, 1983, Am. J. Anat. 166:445-468). Segundo a revisão por Lindsay et al., (1985, J. Cell. Sci. Supp. 3:115-129) crê-se agora que, pelo menos para os pássaros, os neurónios dos gânglios distais do 7º, 9º e 10º nervos cranianos (gânglios do geniculado, rochedo e nodoso, respectivamente) e os neurónios do complexo vestibulo—acústico do 8º nervo craniano, são exclusivamente de origem de placodo neural. O gânglio trigeminal do 5º nervo craniano contém neurónios de origem tanto da crista como do placodo (predominando, no polo ventrolateral do lobo maxilo-mandibular, os neurónios derivados de placodo) enquanto que as células satélite de todos os gânglios cranianos mostraram ter como origem a crista neural.

Em experiências in vitro usando culturas de explante e separadas, enriquecidas em neurónios, de neurónios sensitivos de nervos cranianos e espinais, verificou-se que os neurónios sensitivos de origem na crista neural respondem ao NGF; em contraste, os neurónios derivados de placodos neurais (incluindo os neurónios da porção ventrolateral do gânglio trigeminal e toda a população neuronal dos gânglios vestibular, geniculado, rochedo e nodoso) têm mostrado largamente serem insensíveis ao NGF ao longo do desenvolvimento embrionário. Em contraste com as suas



diferenças de necessidade e resposta ao NGF, tanto os neurónios sensitivos derivados da crista neural como os derivados dos placodos, mostraram (Quadro I) ser sensíveis à sobrevivência e à actividade promotora de neurite do BDNF (Lindsay et al., 1985, J. Cell. Sci. Supp. 3:115-129; Lindsay et al., 1985, Develop. Biol. 112:319-328 Kalcheim and Gendreau, 1988, Develop. Brain Res. 41:79-86). Tebar e Barde (1988, J. Neurosci. 8:3337-3342) estudaram os parâmetros de ligação do BDNF marcado radioactivamente, aos neurónios dos gânglios da raiz dorsal do embrião do pinto; os seus resultados são consistentes com a existência de 2 classes de receptores de BDNF, uma com elevada afinidade para o BDNF, a outra com baixa afinidade. Não se observaram receptores de elevada afinidade nos neurónios simpáticos.

Os alvos neuronais conhecidos do BDNF foram revistos ainda por Barde et al. (1987, Prog. Brain Res. 71:185-189). Antes do presente invento, não era realizável identificar as células que sintetizam o BDNF, devido à falta de sondas de ácidos nucleicos ou de anticorpos, específicas para o BDNF. Houve tentativas mal sucedidas para preparar anticorpos, tanto policlonais como monoclonais, do BDNF. Este fracasso em produzir anticorpos tem impedido a clonação molecular do BDNF, a determinação do efeito fisiológico de privar os neurónios em desenvolvimento de BDNF in vivo, a quantificação de BDNF em tecidos usando imuno-ensaios, e a localização do BDNF usando imunocitoquímica.

QUADRO II  
NEURÓNIOS SENSÍVEIS E NÃO SENSÍVEIS AO BDNF\*

A. Neurónios sensíveis

- I. Neurónios sensitivos do pinto de origem na crista neural:
  - (a) no gânglio da raiz dorsal
  - (b) no gânglio jugular
  - (c) no gânglio trigeminal dorsomédio
  - (d) no núcleo trigeminal mesencefálico\*\*
- II. Neurónios sensitivos do pinto de origem no placodo ectodérmico no:
  - (a) gânglio nodoso
  - (b) gânglio vestibular
  - (c) gânglio do rochedo
  - (d) gânglio geniculado
  - (e) gânglio trigeminal ventrolateral
- III. Células do gânglio retiniano do rato
- IV. Células do gânglio retiniano do pinto

B. Neurónios não-sensíveis

- I. Neurónios simpáticos do pinto e do rato
- II. Neurónios ciliares simpáticos do pinto

---

\* De Barde et al., 1987, Prog. Brain Res. 71:185-189

\*\* Ver Davies et al., 1986, Nature 319:497-499

---

3. SUMARIO DO INVENTO

O presente invento descreve a preparação de sequências de ácidos nucleicos que codificam o factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a sua proteína, fragmentos peptídicos ou derivados, substancialmente puros e em quantidade, e de anticorpos dirigidos contra a proteína, fragmentos peptídicos ou derivados do BDNF. O presente invento disponibiliza, pela primeira vez, quantidades suficientes de BDNF para preparar anticorpos anti-BDNF e permite aplicações de diagnóstico e terapêuticas do BDNF.



Em vários arranjos do invento os ácidos nucleicos, as proteínas, péptidos, derivados ou anticorpos do BDNF, do invento, podem ser utilizados em métodos de diagnóstico e de tratamento de várias doenças e distúrbios neurológicos e, em particular, na diagnose e tratamento de distúrbios dos neurónios sensitivos e na degenerescência da retina. Além disso, em arranjos específicos do invento, os ácidos nucleicos do BDNF ou os produtos de genes do BDNF podem ser usados na diagnose e tratamento do tumor neuroblastoma, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. Os produtos de genes do BDNF podem também ser usados para facilitar a incorporação de implantes em tecidos nervosos ou, em alternativa, para promover a regeneração de nervos após danos por trauma, enfarte, infecção ou post-cirurgia, em outros arranjos específicos do invento.

O invento também descreve a preparação de composições farmacêuticas que incluam quantidades efectivas de produtos de genes do BDNF ou, em alternativa, anticorpos dirigidos contra os produtos de genes do BDNF, que podem ser utilizados na diagnose ou tratamento de várias doenças ou distúrbios neurológicos.

Além disso, por fornecer a sequência completa de nucleótidos do BDNF, o presente invento permite a comparação dos genes do BDNF e NGF, identificando portanto as regiões homólogas e definindo uma família de genes BDNF/NGF. Assim, o presente invento descreve um processo para identificar outros membros da família de genes BDNF/NGF. Num arranjo específico, o processo do invento é usado para identificar um novo membro não-NGF, não BDNF, da família de genes BDNF/NGF. O invento fornece ainda novos membros da família de genes BDNF/NGF identificados de acordo com o processo descrito e com os seus produtos de genes.

### 3.1. ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

|       |                                         |
|-------|-----------------------------------------|
| BDNF  | factor neurotrófico derivado do cérebro |
| hBDNF | BDNF do homem                           |
| CAT   | colina-acetiltransferase                |
| SNC   | sistema nervoso central                 |
| DRG   | gânglios da raiz dorsal (gânglio)       |



|      |                                                               |
|------|---------------------------------------------------------------|
| EDTA | ácido etilenodiamino-tetraacético                             |
| NGF  | factor de crescimento do nervo                                |
| PBS  | (Phosphate Buffered Saline) soro salino tamponado com fosfato |
| PCR  | reação em cadeia de polimerase                                |
| SNP  | sistema nervoso periférico                                    |
| SDS  | dodecilsulfato de sódio                                       |
| Tris | tris(hidroximetil)aminometano                                 |

#### 4. DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Sequência de nucleótidos e sequência deduzida de aminoácidos do ADNc do prepro-BDNF de porcos. A sequência completa de dois clones de ADNc que se justapõem está indicada nesta figura. As sequências de péptidos obtidas por microsequenciamento (Quadro III) estão sublinhadas. A única sequência de consenso para N-glicosilação está duplamente sublinhada. O começo da sequência do BDNF maduro está marcado com um duplo quilate.

Figura 2. Comparação de sequências entre NGF e BDNF. Indicam-se as áreas onde se encontram mais de dois aminoácidos em posições idênticas. As sequências começam com os primeiros aminoácidos de proteínas maduras e terminam com os últimos antes dos códons de paragem. 51 aminoácidos são comuns ao BDNF e os vários NGFs (Schwarz et al., 1989, J. Neurochem. 52:1203-1209), incluindo os seis resíduos de cisteína.

Figura 3. Auto-radiografia de manchas Southern de corte EcoRI de ADN genómico do homem, macaco, rato, ratinho, cão, vaca, coelho, frango e levedura, hibridado com sondas de NGF e BDNF marcadas com <sup>32</sup>P.

Figura 4. Análise de mancha Northern. De cada tecido aplicaram-se 20 µg de ARN total por pista, e hibridaram-se com uma sonda de ARNc, marcada com <sup>32</sup>P, de BDNF de ratinho. Note-se um forte sinal a cerca de 1,45 kB com tecido de cérebro, mas nenhum com os outros 7 tecidos analisados.

Figura 5. Sequência de ADNc de BDNF humano e sequência deduzida de aminoácidos, e comparação de sequências de ADN do rato, porco e frango.



Figura 6. Plasmídeo PCMV1-pBDNF de expressão do BDNF.

Figura 7. (a) Resultados da determinação ELISA de ligação de anti-soros ao péptido B5, usando diluições em série de anti-soros.

(b) Quantificação de ligação de vários anti-soros, diluídos a 1:500, com 50 ng de BDNF.

Figura 8. Resultados de mancha imuno-histoquímica da tirosina-hidroxilase em culturas de mesencéfalo ventral tratadas pelo BDNF (barras a tracejado) e de controlo (barras a cheio).

Figura 9. Tomada de dopamina por culturas de mesencéfalo ventral. As culturas suplementadas com BDNF estão representadas por barras a tracejado; as culturas de controlo estão representadas por barras a cheio.

Figura 10 (a) O efeito do BDNF sobre o número de células positivas à CAT em culturas de neurónios colinérgicos do prosencéfalo.

(b) culturas de neurónios colinérgicos do prosencéfalo, em densidades de 260 000 células por poço (barra negra) ou de 150 000 células por poço (barra a tracejado), foram tratadas com 150 ng/ml de NGF. Compara-se o número de células imunopositivas à CAT em células não tratadas pelo NGF versus células tratadas.

Figura 11. Alterações na intensidade da actividade do enzima CAT, em picomoles de substrato catalisado por minuto, em função da concentração de BDNF em culturas de neurónios colinérgicos do prosencéfalo.

Figura 12. Culturas de células astrogliais, a cerca de 60% de confluência, foram tratadas com (a) factor de crescimento epidérmico (EGF) ou (b) BDNF durante 42 h, depois incubadas com [<sup>3</sup>H]metiltimidina. Mediu-se a quantidade de <sup>3</sup>H incorporada, em relação à concentração de EGF e BDNF.

Figura 13. Mancha Southern de EcoRI restrito, de frango, ratinho e rato, hibridado com sonda R1B/2C de BDNF/NGF. As posições dos fragmentos EcoRI genómico do NGF e BDNF estão



indicadas por N e B, respectivamente.

Figura 14. Comparação de sequências de NGF e BDNF com um novo membro da família BDNF/NGF, identificado por PCR, do ADN do ratinho com iniciadores Caixa 3/Caixa 4: do novo gene [aqui designado como M3/4], também conhecido como Neurotrofina-3 (NT-3) mostra-se somente a sequência da cadeia codificadora e a sequência deduzida de aminoácidos alinhada em relação ao NGF do ratinho maduro e BDNF maduro do porco, rato, ratinho ou homem. Os travessões indicam uma posição onde se usa a eliminação de um codão no NGF para otimizar o alinhamento relativo ao BDNF e M3/4. O itálico indica coincidência nas sequências de aminoácidos e/ou substituições conservadoras de aminoácidos.

Figura 15. Manchas Northern de ARN de várias linhas de células derivadas de tumor humano, hibridadas com sonda de BDNF humano.

Figura 16. Efeito de despolarização dos níveis de ARNm do BDNF nos neurónios do hipocampo.

(a) Decurso da expressão do ARNm do BDNF em culturas primárias de neurónios do hipocampo na presença de KCl 50 mM. O ARN celular total foi extraído de  $0,5 \times 10^6$  células, glioxilado e analisado por electroforese sobre gel a 1,3% de agarose (Biziere, K. and Coyle, T., Neurosci., 1978, Lett. 8:303; McGeer et al., 1978, Brain. Res. 139:381). O ARN transferido para filtros Hybond N foi hibridado com uma sonda de ARNc marcada com  $^{32}\text{P}$  (actividade específica  $10^9$  cpm/ $\mu\text{g}$ ), específica para o BDNF do ratinho, e produzido por transcrição, por escoamento, in-vitro. As duas bandas superiores (4 e 1,5 kb) correspondem ao ARNm do BDNF; as duas bandas do BDNF (4 kb e 1,5 kb) são resistentes à RNase A e representam dois transcritos diferentes que parecem, contudo, ser regulados de modo semelhante) e a inferior (700 bp) corresponde a 10 pg de um padrão curto de recuperação de ARNm do BDNF que se adicionou às amostras antes da extracção do ARN.

(b) Dependência do cálcio. Neurónios foram incubados durante 3 h em meio de cultura (CM) normal, num meio modificado sem cálcio (-Ca) ou em meio de cultura com nifedipina 10  $\mu\text{M}$



(NIF). Onde está indicado (+K) juntou-se KCl 50 mM.

Figura 17. Aumentos dos níveis de ARNm do NGF em neurónios do hipocampo por acção do potássio e do ácido cainico. Incubaram-se neurónios durante 3 h em meio de controlo (C) ou na presença de KCl 50 mM (K+) ou de ácido cainico 25  $\mu$ M (KA). Extraíu-se o ARN e determinaram-se, por PCR quantitativa (11), os níveis de ARNm do NGF. Os valores são médios  $\pm$  SEM (n = 6).

Figura 18. Curva de resposta à dose, sobre o efeito do ácido cainico. Incubaram-se neurónios do hipocampo durante 3 h na presença de várias concentrações de ácido cainico. Extraíu-se o ARN e analisou-se como se descreveu na Fig. 16. Os valores representam médias  $\pm$  SEM de três experiências.

Figura 19. Decurso dos aumentos de níveis de ARNm do BDNF e NGF devidos aos tratamentos pelo ácido cainico. Extraíu-se o ARN celular total, e analisou-se como se indica na Fig. 16, a partir do hipocampo (a) ou do cortex (b) nos tempos indicados (em horas) após injeção intraperitoneal de ácido cainico (12 mg/kg). Injectou-se uma única dose de diazepam (10 mg/kg) 90 min depois do ácido cainico (as duas bandas do BDNF (4 kb e 1,5 kb) são resistentes ao RNase A e representam dois transcritos diferentes que parecem contudo ser regulados de modo semelhante). Indicam-se os valores correspondentes a 1,5 kb ARNm do BDNF (o) e 1,3 kb ARNm do NGF (o). Observaram-se aumentos semelhantes para o 4 kb ARNm do BDNF. Os valores dados representam médias  $\pm$  SEM de 3 a 4 experiências.

Figura 20. Efeito de anticonvulsivos na expressão do ARNm do BDNF induzida pelo ácido cainico. Injectaram-se ratos intraperitonealmente com diazepam (10 mg/kg) (DZ); MK-801 (1 mg/kg) (MK) ou quetamina (20 mg/kg) (KET) 15 min antes da injeção de ácido cainico (12 mg/kg) (+KA) ou soro salino (controlos). Três horas mais tarde usou-se tecido do hipocampo para preparar ARN total como se indica na Fig. 16. Os valores representam médias  $\pm$  SEM de três experiências.

Figura 21. Culturas de Células Septais.

A-F. Micrografia de contraste de fase do decurso do



crescimento de células em cultura. As células foram colocadas em placas a uma densidade de  $1,3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> e mantidas em 5 HS/NS como se descreveu no texto. Os tempos de registo foram 1 (A, B), 2 (C, D) e 4 (E, F) dias. Foram usados marcadores específicos do tipo de células para identificar as populações de células, os neurónios (G, H) marcados histoquimicamente com AChE e os neurónios (I) imunopositivos do receptor de NGF. Escala = 25 µm.

Figura 22. Comparação da Resposta de Células Septais Dissociadas ao Tratamento com BDNF ou NGF, com Base no Número de Células AChE.

(A). Comparação da resposta ao BDNF (25 ng/ml), NGF (50 ng/ml) ou à combinação dos dois ligandos a diferentes densidades de colocação na placa. (B) Comparação da resposta de neurónios colinérgicos a uma zona de concentrações (0-50 ng/ml) de BDNF ou NGF. Para estes resultados as células cresceram durante um período de 11-12 dias em meio contendo soro. Os pontos representam médias  $\pm$  SEM de 6-9 determinações.

Figura 23. O gráfico de barras descreve o efeito do atraso da adição de BDNF ou NGF a culturas septais dissociadas. Juntou-se BDNF (50 ng/ml) ou NGF (50 ng/ml) a células de culturas dissociadas com atrasos de 5-6 h (+12), 5 dias (-5/+7) ou 7 dias (-7/+5). Mantiveram-se as culturas durante 12 dias. As células foram pontuadas com base na mancha histoquímica positiva à AChE. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM de 4 a 5 determinações.

Figura 24. Gráfico de barras mostrando a capacidade do BDNF ou NGF regular o número de células imunopositivas do receptor do NGF.

O imuno-registo do receptor de NGF foi conduzido utilizando o anticorpo monoclonal 192-IgG a uma diluição de 1:1000. As células septais dissociadas foram colocadas em placa a uma densidade de  $1,3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> e tratadas continuamente durante um período de 12 dias. Faz-se uma comparação entre a dose saturante de NGF e uma zona de doses de BDNF (0-100ng/ml). Os



resultados são a média  $\pm$  SEM de um  $n = 4$ .

Figura 25. Curva de Resposta a Doses de Neurónios Colinérgicos Septais a Actividades Indutoras de CAT do BDNF (A) e NGF (B).

As culturas foram colocadas sobre placas, em poços de 6 mm, cobertos com poliornitina e laminina e mantidas durante 12 dias em 5 HS/N3. Expuseram-se as células ao BDNF ou NGF 5 a 6 h após colocação na placa. Substituíam-se os factores em cada 3 dias quando se mudava o meio. Os resultados indicados representam a média  $\pm$  SEM de um  $n$  de 5 a 6 determinações.

Figura 26. Efeito de Resposta à Dose do BDNF e NGF sobre a Actividade do Enzima AChE.

Desenvolveram-se neurónios colinérgicos septais de rato, durante 12 dias, em meio contendo soro com suplementos hormonais. Trataram-se as células com BDNF (quadrados claros) e NGF (quadrados a cheio) como se descreve na Figura 25. Os resultados são a média  $\pm$  S.E.M. de um  $n$  de 6 a 9. A actividade do AChE em culturas não tratadas foi de  $16,4 \pm 2$  nmol/h/poço.

Figura 27. Decurso do Aumento da Actividade do Enzima CAT Induzida pelo BDNF quando comparado com o do NGF.

O tempo necessário para estimular a actividade do CAT foi determinado sobre células em placa a uma densidade de  $2,3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> e desenvolvidas durante vários periodos de tempo, em meio contendo soro com suplementos hormonais e factores exógenos. As células foram inicialmente expostas ao BDNF (quadrados claros) ou ao NGF (quadrados a cheio) 5-6 horas depois da colocação em placa. Os resultados representam a percentagem da actividade determinada em culturas tratadas versus culturas não tratadas ( $n = 6$ , BDNF 12 dias  $n = 3$ ).

Figura 28. Comparação do Efeito de Células Gliais sobre a Capacidade do BDNF Induzir a Actividade do Enzima CAT. Colocaram-se em placa células septais a uma densidade de  $2,3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Depois de um periodo na placa de 5-6 h, mudou-se o meio quer para um meio livre de soro quer para um meio contendo



soro, ambos suplementados com 1% N3 como se indica no texto. Juntou-se citosina arabinósido ( $1 \mu\text{M}$ ) durante 24 h para reduzir ainda mais o número de astrócitos. Mantiveram-se então as culturas durante 12 dias. Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de 4 determinações.

Figura 29. O Gráfico de Barras Mostra o Efeito do Tratamento pelo BDNF ou NGF sobre o Nível de Tomada de Colina de Alta-Afinidade.

A tomada de colina foi conduzida em células mantidas durante 11 dias, após colocação em placa a uma densidade de  $1,3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. O BDNF (50 ng/ml) ou NGF (50 ng/ml) estiveram presentes durante todo o período de cultura. Os pontos representam a média  $\pm$  SEM de 5 determinações de BDNF e 10 de NGF.

Figura 30. Resolução por SDS PAGE de produtos de reacção, marcados com <sup>35</sup>S, de cisão enzimática do factor neurotrófico derivado do cérebro do homem, pela tripsina e endoproteínase Arg-C.

Figura 31. Representação gráfica da bioavaliação de DRG comparando CHO-hBDNF não tratado com CHO-hBDNF cindido pela endoproteínase. O crescimento de neurite é pontuado de 0 a 5, representando 5 a bioactividade máxima.

Figura 32. Fotomicrografias em contraste de fase (A) e em campo brilhante (B, C) de culturas dissociadas de células do mesencéfalo ventral do rato E14 coradas, após 9 dias em cultura, com anticorpos monoclonais contra a tirosina-hidroxilase (TH).

A e B. Fotografias em contraste de fase e em campo brilhante do mesmo campo, mostram a escassa abundância de neurónios TH+ nestas culturas. Somente um só neurónio TH+ (setas) é visto num campo contendo muitos neurónios de fase brilhante com longas neurites. São evidentes algumas células não neuronais, por morfologia ou por mancha de GFAP (não indicada).

C. Fotografia em campo brilhante mostrando dois neurónios TH+ (pequenas setas) num campo contendo cerca de 98 células de fase brilhante de morfologia neuronal. Escala = 100  $\mu\text{m}$ .



Figura 33. Fotomicrografias de grande ampliação, de culturas de 6 dias de células do mesencéfalo ventral do rato E14 mostrando diversas morfologias de neurónios TH+, algumas com extenso crescimento neurítico e cones de crescimento (A, B) extremamente elaborados. As culturas foram estabelecidas e coradas como se descreve na legenda da Fig. 32. Escala = 25  $\mu$ M.

Figura 34. O BDNF promove a sobrevivência de neurónios TH+, dopaminérgicos mesencefálicos em cultura de modo dependente da dose, evidente em períodos de cultura mais longos do que 3 dias.

A. Comparação do número de neurónios TH+ em culturas de mesencéfalo ventral do rato E14, mantido com (barras a cheio) ou sem BDNF (barras a claro). Nas culturas tratadas, juntou-se uma vez BDNF (50 ng/ml) sobre a cultura do dia 2. Não se observaram diferenças entre as culturas de controlo e as tratadas no dia 3, mas o número de neurónios TH+ em culturas tratadas pelo BDNF foi 1,8 vezes maior do que nos controlos do dia 8. Os valores são a média de amostras em duplicado.

B. O efeito do BDNF no aumento de sobrevivência de neurónios TH+ é dependente da dose.

O número de neurónios TH+ foi determinado em culturas em duplicado, após 8 dias em cultura, na ausência de BDNF ou em meio contendo concentrações crescentes de BDNF adicionadas no dia 2.

C. O NGF não tem efeito sobre a sobrevivência de neurónios TH+.

Para avaliar a especificidade do BDNF, desenvolveram-se também culturas na presença ou ausência de NGF (50 ng/ml) durante 8 dias e analisaram-se quanto a células TH+. O NGF, adicionado no dia 2, não aumentou a sobrevivência de neurónios TH+ em culturas examinadas quer no dia 6 quer no dia 8. Os resultados são a média de placas em duplicado.

Figura 35. Doses repetidas de BDNF aumentam ainda mais a sobrevivência de neurónios TH+ quando se compara com a adição única de BDNF no dia 2.

Prepararam-se culturas como se descreveu no texto. Purifi-



cou-se BDNF recombinante humano a partir de células COS M5. Trataram-se as culturas com uma única adição (SA; barras a ponteados) de BDNF (50 ng/ml) no dia 2, ou com doses repetidas de BDNF (50 ng/ml) nos dias 1, 2, 4, 6 e 8 (MA - múltipla adição; barras a cheio) ou desenvolveram-se sem BDNF (controle; barras a claro). Nas alturas indicadas, as culturas foram fixadas e coradas para determinação da imuno-reactividade dos TH. O reabastecimento de BDNF por adições múltiplas resultou num número 2,7 X maior de neurónios TH+ no dia 11, quando comparado com o controle, enquanto que o aumento máximo observado com uma única adição de BDNF foi apenas de 2 X após 11 dias. Os resultados, típicos de várias experiências, são a média de amostras em duplicado.

Figura 36. A adição retardada de BDNF não aumenta o número de neurónios TH+ na mesma extensão observada quando o BDNF é adicionado no dia 2.

Foram preparadas culturas como se descreveu no texto, com excepção do tempo de adição do BDNF exógeno. Todas as culturas foram mudadas para um meio livre de soro no dia 2 e juntou-se BDNF (50 ng/ml, BDNF de cérebro de porco) numa só vez quer no dia 2, dia 5 ou dia 7 (CD2, CD5, CD7). Nos dias de cultura 6, 8 e 10, o número de neurónios TH+ foi determinado em culturas em duplicado. Nesta experiência, uma única adição de BDNF no dia 2 deu um número 3 X maior de neurónios TH+ no dia 10. Quando o BDNF se juntou, em atraso, no dia 5, observou-se no dia 10 um aumento de neurónios TH+ sobre os controlos mas inferior a 2 X, e esta diferença de número de células TH+ entre culturas tratadas e de controle, não aumentou mais com tempo maior de cultura. Controlos, barras a claro; adição de BDNF no dia 2, barras a ponteados; BDNF adicionado no dia 5, barras a cheio; BDNF adicionado no dia 7, barras tracejadas em diagonal.

Figura 37. Resposta dependente da dose, do BDNF na tomada de GABA de alta afinidade em culturas de hipocampo.

Juntou-se nBDNF parcialmente purificado (purificado por "rotaphor" a partir de sobrenadantes de COS M5) a culturas de



várias diluições. Verificou-se que o BDNF à diluição de  $1 \times 10^{-2}$  tinha actividade máxima promotora de neurite no gânglio da raiz dorsal do pinto E8. A tomada de  $^3\text{H}$ -GABA de alta afinidade foi medida após 8 dias de tratamento in vitro com BDNF.

Figura 38. O BDNF protege neurónios dopaminérgicos nigrais de cultura dos efeitos neurotóxicos de MPP+. Estabeleceram-se culturas a partir de embriões de ratos E14 como se descreve na Figura 1. Após 24 h *in vitro* mudou-se o meio de cultura para a formulação livre de soro. Após 3 dias em cultura, dividiram-se as culturas em 4 grupos de 6 placas de 35 mm. Manteve-se um grupo como grupo de controlo e os outros receberam (i) factor básico de crescimento de fibroblastos, 10 ng/ml (bFGF de cérebro bovino); (ii) NGF de ratinho, 50 ng/ml ou (iii) BDNF, 50 ng/ml. Mantiveram-se as culturas por mais 24 h antes de expor 3 placas de cada grupo a MPP+ 1  $\mu\text{M}$  (Research Biochemicals, Inc., Natick, MA) durante 48 h. No fim da experiência, 6 dias no total, todas as placas foram avaliadas quanto a imuno-reactividade a TH e determinou-se o número de células TH+ em cada grupo. Os resultados apresentados representam o número de neurónios TH+ após tratamento com MPP+, calculado como percentagem do número de neurónios de TH+ em culturas semelhantes não expostas a MPP+. Todos os valores são médias  $\pm$  s.e.m. de culturas em triplicado.

##### 5. DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

O presente invento descreve a preparação de sequências de ácidos nucleicos codificando o factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) bem como a proteína, fragmentos peptídicos e derivados do BDNF, preparados em quantidade usando estas sequências. Além disso, o invento descreve a preparação de composições farmacológicas e descreve os usos terapêuticos do BDNF, fornecendo, pela primeira vez, os meios de obtenção de quantidades suficientes de BDNF substancialmente puro para uso clínico. O invento também descreve a preparação de anticorpos dirigidos contra o BDNF ou os seus fragmentos, fornecendo um processo para obter imunogéneo suficiente. Além disso, por permitir a comparação de sequências de ácidos nucleicos do BDNF e NGF, o presente invento permite a identificação de regiões homólogas das sequên-



cias de ácidos nucleicos, entre o BDNF e o NGF, definindo portanto uma família de genes BDNF/NGF; o invento apresenta um processo para identificar e isolar novos membros desta família de genes.

Para melhor clareza da descrição, e não a título de limitação, o invento será descrito nas seguintes partes:

- (i) purificação do BDNF
- (ii) bioavaliação do BDNF
- (iii) microsequenciamento da proteína do BDNF
- (iv) clonagem do DNA codificador do BDNF
- (v) expressão do BDNF
- (vi) genes e proteínas do BDNF
- (vii) obtenção de anticorpos anti-BDNF
- (viii) identificação de novos membros da família de genes BDNF/NGF
- (ix) utilidade do invento
- (x) composições farmacêuticas

#### 5.1. PURIFICAÇÃO DO FACTOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO

A fim de identificar os ácidos nucleicos que codificam o BDNF, podem obter-se alguns microgramas de proteína do BDNF a partir de tecidos para determinar as sequências de aminoácidos que podem então ser usados para obter sondas de oligonucleótidos. A extrema raridade da proteína do BDNF praticamente limita a quantidade de sequências de aminoácidos que pode ser determinada. O BDNF pode ser preparado a partir de cérebro de porco pelos métodos descritos em Barde et al., (1982, EMBO J. 1:549-553), ou Hofer and Barde (1988, Nature 331:261-262).

De preferência o BDNF pode ser preparado de acordo com o seguinte protocolo detalhado, apresentado como exemplo e não a título de limitação; podem ser consideradas várias modificações para uso do perito na arte. Devido à raridade do BDNF, podem usar-se de preferência cerca de 6 quilogramas de tecido de cérebro num processo de purificação. O tecido de cérebro pode ser homogeneizado em tampão de fosfato de sódio a uma concentração de cerca de 0,2 M de fosfato de sódio e a um pH de aproximadamente



6, contendo EDTA 1 mM e fluoreto de fenilmetano-sulfonilo 1 mM recentemente adicionado, de modo que a proporção de tecido de cérebro/fluido seja aproximadamente 1 kg de cérebro para 2 l de tampão. Pode então usar-se ácido clorídrico para justar o pH da mistura até aproximadamente 4, e pode então agitar-se a mistura durante cerca de 2 h a 4°C. Pode depois centrifugar-se a mistura durante 25 min a 20 000 g. Após centrifugação recolhe-se o sobrenadante, ajusta-se até um pH de cerca de 6,0 usando hidróxido de sódio e depois agita-se com cerca de 1 l de carboximetilcelulose pré-intumescida (por 6 kg de tecido de cérebro) que tinha sido equilibrada com fosfato de sódio 0,1 M a um pH de 6. Depois de várias lavagens com um total de cerca de 20 l de fosfato de sódio 0,1 M, pH 6, a suspensão pode ser vertida numa coluna e lavada com o mesmo tampão contendo NaCl 0,13 M, de preferência durante a noite. As fracções activas, identificadas por bioavaliação sensível ao BDNF (ver Secção 5.2, abaixo), podem então ser eluídas com tampão fosfato contendo NaCl 0,5M e subsequentemente dialisadas contra diversas mudanças de cerca de 5 l de fosfato de potássio 5 mM a um pH de 6,8. As fracções dialisadas podem depois ser aplicadas a uma coluna de hidroxiapatite com um volume de leite de cerca de 20 ml por cada kg de tecido de cérebro processado; a coluna de hidroxiapatite deverá ser pré-equilibrada com fosfato de potássio 5 mM a um pH de 6,8 antes da aplicação da amostra. A coluna pode então ser eluída com um gradiente linear composto de 500 ml de fosfato de potássio 5 mM e 500 ml de fosfato de potássio 700 mM, ambos a um pH de cerca de 6,8. A actividade do BDNF deverá ser optimamente eluída aproximadamente às 500 mM do fosfato de potássio. As fracções activas misturadas podem depois ser ajustadas a uma molaridade final de cerca de 700 mM de fosfato de potássio e aplicadas a uma coluna de fenil-sefarose (com um volume de cerca de 5 ml por cada 6 kg de tecido de cérebro processados), equilibrada com uma solução de fosfato de potássio 700 mM com um pH de 6,8. Depois de lavar com aproximadamente 40 ml do mesmo tampão, a actividade do BDNF pode ser eluída com fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, e depois a actividade do BDNF pode ser dialisada contra água destilada, e depois liofilizada. O material



lioofilizado pode ser tomado num tampão de amostra de electroforese de gel com SDS, contendo 0,1% de SDS mas de preferência não contendo mercaptoetanol, e aplicado a um gel de SDS compreendendo um gradiente linear de 10 a 25% de acrilamida. Depois de se completar a separação por electroforese, o gel pode ser corado durante cerca de 10 min com azul de Coomassie e descorado durante cerca de 20 min. Uma banda migradora ao nível de um marcador de citocromo C pode ser retirada e eluída do gel, por electroforese. O SDS pode ser em grande parte removido como foi descrito por Weber and Kuter (1971, J. Biol. Chem. 246:4504-4509). Note-se que a remoção do SDS não é em geral completa. Um processo para o microsequenciamento do BDNF foi modificado por Hofer and Barde (1988, Nature 331:261-262), e não recorre à electroforese de gel como último passo da purificação.

#### 5.2. BIOAVALIAÇÃO DO FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO

Pode usar-se qualquer método que indique, qualitativamente ou quantitativamente, a actividade do BDNF, de acordo com o presente invento. Estas bioavaliações podem ser úteis na identificação e/ou medida da actividade do BDNF natural ou recombinante.

Pode usar-se qualquer bioavaliação do BDNF conhecida na arte. Por exemplo, podem utilizar-se neurónios do gânglio da raiz dorsal (DRG) do embrião do pinto numa avaliação de BDNF, como se descreveu em Barde et al. (1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:1199-1203).

A título de exemplo, os gânglios da raiz dorsal de embriões de pinto do dia 6 ao dia 14, e de preferência embriões de pinto de 10 a 12 dias, podem ser recolhidos usando as técnicas de dissecação já conhecidas na arte e imediatamente colocados num pequeno volume de meio F14 (feito de pó GIBCO F-12, suplementado como em Vogel et al., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69:3180-3184), que deverá ser substituído no fim da dissecação por soro salino tamponado com fosfato (PBS) livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , contendo cerca de 0,1% de tripsina. Após cerca de 20 min de incubação a 37°C, os gânglios podem ser centrifugados e lavados



2X com meio F14 contendo cerca de 10% v/v de soro de cavalo, inativado pelo calor. Os gânglios podem então ser dissociados por trituração suave (cerca de 10-15 aspirações) usando uma pipeta de pasteur siliconizada de pequeno diâmetro (cerca de 1 mm). Os aglomerados remanescentes de tecido podem então ser de preferência removidos passando a suspensão de células por uma rede de nylon, com poros de cerca de 40  $\mu$ m. A suspensão de células pode depois ser pré-colocada em placa durante cerca de 210 min sobre uma placa plástica de cultura de tecidos; durante este período, a maior parte das células não neuronais deverá aderir à superfície plástica, deixando em suspensão uma população de células enriquecida de neurónios. As células podem ser diluídas até uma concentração de cerca de  $5 \times 10^3$  células por ml de meio de placa (de preferência meio F-14 suplementado com 10% v/v de soro de cavalo, inativado pelo calor, juntamente com antibióticos) e colocadas em poliornitina ou de preferência em placas de cultura de tecidos, revestidas de poliornitina/laminina (ver infra).

Em alternativa, e não como limitação, as bioavaliações de BDNF que sejam relativamente insensíveis ao NGF podem, nalgumas circunstâncias, ser preferíveis a sistemas, tal como o sistema de DRG acima descrito, que podem, em certas condições, responder tanto ao BDNF como ao NGF. Estes sistemas relativamente específicos do BDNF incluem culturas do gânglio da retina bem como culturas de neurónios derivados de placodos neurais.

As células da retina peri-natal podem ser cultivadas de acordo com os métodos descritos em Johnson et al. (1986, J. Neurosci. 6:3031-3038). Por exemplo, as retinas podem ser removidas de animais peri-natais (no rato o termo "peri-natal" refere-se a embriões do dia embrionário 17 até filhotes post-natais com 48 h após nascimento), lavadas em soro salino tamponado com fosfato (PBS) livre de cálcio e magnésio, depois incubadas em PBS contendo cerca de 0,05% - 0,1% de tripsina durante aproximadamente 15 min a cerca de 37°C. Após digestão proteolítica, as retinas podem ser lavadas em meio de cultura F14 contendo cerca de 10% v/v de soro de cavalo (HS), inativado pelo



calor, (F14-HS). As retinas são então dissociadas por pipetagem suave num pequeno volume (cerca de 1-10 ml) de F14-HS fresco. Deixa-se o tecido não dissociado assentar e pipetam-se para fora da cultura as células remanescentes e o meio.

Em alternativa, as bioavaliações de BDNF que compreendem células derivadas de placodos neurais podem ser usadas de acordo com o invento. Explantes do nervo craniano embrionário, p. ex. da porção ventrolateral do gânglio do trigêmeo ou dos gânglios vestibular, geniculado, rochedo ou nodoso, podem ser cultivados em gel de cologéneo coberto com meio de cultura, como se descreve em Davies et al. (1986, J. Neurosci. 6:1897-1904) ou dissociados de acordo com Barde et al. (1980, Proc. Natl. Acad. Sci. 77:1199-1203).

Como se tem observado que a capacidade de resposta ao BDNF pode ser aumentada 10X por alteração do substrato de crescimento, da poliornitina para a laminina-poliornitina (Barde et al., 1987, Prog. Brain Res. 71:185-189) as bioavaliações de BDNF fazem-se de preferência sobre substratos com laminina. As superfícies das culturas podem ser preparadas, p. ex., (i) revestindo a superfície da cultura durante cerca de 8-10 h com uma solução estéril de poliornitina; (ii) lavando várias vezes com água estéril; e (iii) revestindo a superfície da cultura durante cerca de 2 h com laminina a uma concentração de aproximadamente 25 µg/ml em PBS (Johnson et al., 1986, J. Neurosci. 6:3031-3038).

Em qualquer sistema de bioavaliação de acordo com o invento, pode estabelecer-se uma curva de resposta à dose de BDNF, usando os métodos já conhecidos na arte. Usando uma avaliação do gânglio sensitivo dissociado, do pinto, observou-se metade da sobrevivência máxima com uma concentração de cerca de 5 ng/ml de BDNF purificado e observou-se uma sobrevivência máxima com uma concentração entre cerca de 10 e 20 ng/ml de BDNF purificado (Barde et al., 1987, Prog. Brain Res. 71:185-189).

### 5.3. MICROSSEQUENCIAMENTO DA PROTEÍNA DO FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO

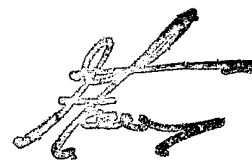
A proteína do BDNF preparada a partir do cérebro pode ser



sequeenciada; deve contudo realçar-se que a extrema raridade da proteína torna improvável que se possa obter com confiança uma porção substancial da sequência da proteína do BDNF. A proteína pode ser directamente sequeenciada ou inicialmente cindida por qualquer protease ou outro composto conhecido na arte, incluindo (mas sem limitação) o Staphylococcus aureus V8, a tripsina e o brometo de cianogéneo. Os péptidos podem ser sequeenciados por degradação automatizada Edman num micro-sequeenciador de fase gasosa de acordo com o métodos de Hewick et al. (1981, J. Biol. Chem. 256:7990-7997) e Hunkapillar et al. (1983, Methods Enzymol. 91:227-236). A detecção de aminoácidos pela feniltio-hidantoína pode ser então conduzida de acordo com Lottspeich (1985, Chromatography 326:321-327). Fragmentos sobrepostos da sequência de aminoácidos podem ser determinados e usados para deduzir comprimentos mais longos de sequências contiguas.

#### 5.4. CLONAÇÃO DO ADN CODIFICADOR DO FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO

A raridade do BDNF efectivamente exclui o uso das estratégias clássicas para clonação do gene de BDNF. Por exemplo, se se usar a sequência de proteína disponível para criar uma sonda de oligonucleótidos, marcada, complementar, e esta sonda foi usada para pesquisar a biblioteca de ADNc obtida do tecido, que se presume sintetizar o BDNF, o número de clones positivos será tão pequeno a ponto de ser evanescente. O presente invento apresenta uma combinação de processos para a clonação do gene de BDNF, que compreende a purificação de quantidades adequadas de proteína de BDNF, o microsequeenciamento da proteína do BDNF, a obtenção de uma sonda de oligonucleótidos, a construção de uma biblioteca de ADNc, a amplificação baseada na sequência derivada de aminoácidos do BDNF e, finalmente, a selecção do gene do BDNF. Neste método do invento, o processo preferido de amplificação utiliza a amplificação das sequências de ácidos nucleicos do tecido por reacção em cadeia de polimerase (PCR) (Saiki et al., 1985, Science 230:1350-1354), com vista a expandir o número de sequências do BDNF disponíveis para clonação. Segue-se uma descrição detalhada do processo preferido.



Primeiro, a sequência de aminoácidos derivada da proteína purificada do BDNF pode ser usada para deduzir os iniciadores de oligonucleótidos a utilizar na reacção em cadeia de polimerase. Devido à degenerescência do código genético no qual vários tripletos de ácidos nucleicos podem especificar o mesmo aminoácido, vários oligonucleótidos deverão ser sintetizados numa dada sequência de aminoácidos com vista a obter combinações múltiplas potenciais de sequências de aminoácidos; os oligonucleótidos resultantes são referidos como iniciadores degenerados.

A reacção em cadeia de polimerase (PCR) exige iniciadores de cadeia, de sentido bem como de anti-sentido. Assim pode usar-se um iniciador degenerado de oligonucleótidos correspondente à sequência de aminoácidos do BDNF como iniciador para uma cadeia do ADN e um segundo iniciador, homólogo a uma sequência de ADN de ocorrência comum, p. ex. um trecho de resíduos de timidina resultante da transcrição inversa da cauda de poliadenosina de ARNms, pode ser usado como iniciador da segunda cadeia do ADN. Estes iniciadores podem então ser utilizados na reacção em cadeia de polimerase com um padrão de ácidos nucleicos que se presume conter as sequências codificadoras do BDNF, p. ex. ADN genómico ou de preferência ADNc preparado a partir de ARNm recolhido de tecidos que se presume sintetizarem o BDNF. Os produtos da reacção do ADN podem depois ser analisados por eletroforese para determinar se o produto de reacção do ADN tem um tamanho molecular semelhante ao tamanho esperado do gene de BDNF e, de preferência, por análise de sequência de nucleótidos.

Contudo, como o uso de dois iniciadores degenerados na PCR aumenta a possibilidade de amplificar as sequências de ácidos nucleicos que não codificam o BDNF, um processo preferido utiliza apenas um iniciador degenerado, correspondendo o outro iniciador à sequência exacta do BDNF. Com vista a identificar a sequência exacta do BDNF, pode usar-se a sequência de aminoácidos determinada usando proteína purificada do BDNF, para obter ambos os iniciadores de oligonucleótidos de sentido e anti-sentido. O produto de reacção do ADN resultante do uso destes iniciadores na PCR, usando, como molde, os ácidos nucleicos que codificam o BDNF,



deverá ser um fragmento de ácidos nucleicos que codifica o trecho de aminoácidos usado para a obtenção dos iniciadores e pode ter um tamanho predizível (p. ex. no mínimo, o número de resíduos de aminoácidos multiplicado por 3, em pares de base, de comprimento). A análise sequencial do produto de reacção do ADN pode agora ser comparada com a da sequência de aminoácidos investigada, para confirmar que a sequência de aminoácidos amplificada pode de facto codificar o fragmento peptídico de BDNF. Ainda que possa ser utilizado qualquer processo de sequenciamento de ácidos nucleicos já conhecido na arte, é preferível usar o processo de terminação da cadeia por didesoxinucleótidos (Sanger et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3918-3921). O sequenciamento pode ser conseguido usando gel purificado ou, de preferência, produto de reacção de ADN clonado. Pode então usar-se o produto de reacção de ADN para obter um iniciador de oligonucleótidos correspondente à sequência exacta de codificação do BDNF. Este iniciador pode depois ser usado juntamente com um segundo iniciador, que pode ser degenerado, para aumentar a extensão da sequência de BDNF para além da representada pelo fragmento de sequência exacta determinada inicialmente. Por exemplo, e não a título de limitação, o iniciador de sentido da espira pode corresponder à sequência exacta de nucleótidos do BDNF, enquanto que o iniciador anti-sentido pode ser um iniciador degenerado homólogo a uma região de sequência que provavelmente se encontra a montante do fragmento sequenciado, p. ex. a cauda de poliadenosina do ARNm inversamente transcrita no ADNc. Pode ser necessário usar um método semelhante para achar a sequência a montante do fragmento sequenciado; por exemplo, o iniciador da cadeia anti-sentido pode corresponder à sequência exacta de nucleótidos do BDNF e o iniciador da cadeia de sentido pode ser um iniciador degenerado, homólogo a uma região a montante da sequência do BDNF acima do fragmento sequenciado, p. ex. uma cauda 5' de poliadenosina adicionada ao extremo 5' do ADNc recorrendo a uma transferase de desoxinucleótido terminal. Pode assim ser montada a sequência do gene completo ou do ARNm do BDNF.



Os produtos de reacção do ADN podem ser clonados recorrendo a qualquer método já conhecido na arte. Pode usar-se um grande número de sistemas vector-hospedeiro já conhecidos na arte. Os vectores possíveis incluem, mas sem a tal estarem limitados, cosmídeos, plasmídeos ou vírus modificados, com a restrição do sistema de vectores ser compatível com a célula hospedeira utilizada. Estes vectores incluem (sem limitação) bacteriófagos como os derivados lambda ou plasmídeos como o pBR322, pUC ou os derivados de plasmídeos do Bluescript(R) (Stratagene). As moléculas recombinantes podem ser introduzidas em células hospedeiras via transformação, transfecção, infecção, electroporação, etc..

O gene do BDNF é inserido num vector de clonação que pode ser usado para transformar, transfectar ou infectar células hospedeiras apropriadas de forma a criarem-se muitas cópias das sequências dos genes. Isto pode conseguir-se ligando o fragmento de ADN num vector de clonação que tenha limites coesivos complementares. Contudo, se os locais de restrição complementares, usados para fragmentar o ADN, não estiverem presentes no vector de clonação, os extremos das moléculas de ADN podem ser modificadas enzimaticamente. Pode ser vantajoso incorporar locais de cisão de endonuclease de restrição nos iniciadores de oligonucleótidos usados na reacção em cadeia de polimerase, para facilitar a inserção dos vectores. Em alternativa, qualquer local pretendido pode ser produzido ligando sequências de nucleótidos (ligadores) aos limites do ADN; estes ligadores ligados podem incluir oligonucleótidos específicos, sintetizados quimicamente, codificadores de sequências de reconhecimento das endonucleases de restrição. Num processo alternativo, o vector clonado e o gene de BDNF podem ser modificados por caudas homopoliméricas.

Em certos arranjos específicos, a transformação de células hospedeiras com moléculas de ADN recombinante que incorporem um gene isolado de BDNF, ou uma sequência sintetizada de ADN, permite a obtenção de cópias múltiplas do gene. Assim o gene pode ser obtido em grandes quantidades pelo crescimento de transformantes, isolando as moléculas de ADN recombinante dos transformantes e, quando necessário, separando o gene inserido do



ADN recombinante isolado.

De acordo com um arranjo preferido do invento, uma vez criado um clone derivado do ADNc codificador do BDNF, pode isolar-se um clone genómico codificador do BDNF recorrendo às técnicas clássicas conhecidas na arte. Por exemplo uma sonda de ácidos nucleicos, marcada, pode ser obtida do clone de BDNF e usada para pesquisar bibliotecas de ADN genómico por hibridação de ácidos nucleicos, usando, p. ex., o método estabelecido por Benton and Davis (1977, Science 196:180) para bibliotecas de bacteriófagos e Grunstein and Hogness (1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3961-3965) para bibliotecas de plasmídeos. Os clones recuperados podem então ser analisados por meio de mapas de fragmentos de restrição e por técnicas de sequenciamento, de acordo com métodos já bem conhecidos na arte.

Além disso, outros clones de ADNc podem ser identificados a partir de uma biblioteca de ADNc usando as sequências obtidas segundo o invento.

#### 5.5. EXPRESSÃO DO GENE DO FACTOR NEUROTROFICO

##### DERIVADO DO CÉREBRO

A sequência de nucleótidos que codifica a proteína do BDNF ou de uma sua porção, pode ser inserida num vector de expressão apropriado, isto é, num vector que contém os elementos necessários para a transcrição e tradução da sequência inserida que codifica a proteína. Os sinais necessários de transcrição e tradução podem também ser fornecidos pelo gene do BDNF nativo e/ou das suas regiões de flanco. Podem utilizar-se diversos sistemas de vector-hospedeiro para expressar a sequência codificadora da proteína. Estes incluem, mas a tal não estão limitados, sistemas de células de mamíferos infectadas com vírus (p. ex. vaccinia virus, adenovirus, etc.); os sistemas de células de insectos infectados com vírus (p. ex. baculovirus); microrganismos como a levedura contendo vectores de levedura, ou bactérias transformadas por ADN bacteriofágico, ADN plasmídico ou ADN cosmídico. Os elementos de expressão destes vectores variam em força e especificidade. Dependendo do sistema de vector-hospe-



deiro utilizado, pode usar-se um qualquer dos vários elementos de transcrição e tradução adequados.

Qualquer dos processos anteriormente descritos para inserção de fragmentos de ADN num vector, pode ser usado para construir vectores de expressão contendo um gene quimérico constituído por sinais de controlo de transcrição/tradução e por sequências codificadoras de proteína. Estes processos podem incluir ADN recombinante in vitro, técnicas de síntese e recombinações in vivo (recombinação genética). A expressão da sequência de ácidos nucleicos codificadora de uma proteína de BDNF ou de um fragmento de péptido, pode ser regulada por uma segunda sequência de ácidos nucleicos de forma a que a proteína de BDNF ou do péptido seja expressa num hospedeiro transformado pela molécula de ADN recombinante. Por exemplo, a expressão do BDNF pode ser controlada por qualquer elemento promotor/melhorador já conhecido na arte. Os promotores que podem ser usados para controlar a expressão da BDNF incluem, sem que tal constitua limitação, a região promotora inicial SV40 (Berndt e Chambon, 1981, Nature 290:304-310), o promotor contido no motivo de repetição do terminal longo 3' do vírus do sarcoma de Rous (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797), o promotor da timidina quinase da herpes (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:144-1445), as sequências reguladoras do gene da metalotionina (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42); vectores de expressão procariótica como o promotor da  $\beta$ -lactamase (Villa-Komaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3427-3731) ou o promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25), ver também "Useful proteins from recombinant bacteria" na Scientific American, 1980, 242:74-94; vectores de expressão de plantas compreendendo a região promotora da nopalina sintetase (Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213) ou o promotor do ARN do vírus do mosaico da couve-flor 35 S (Gardner et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871) e o promotor do enzima fotossintético ribulose bifosfato carboxilase (Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 310:115-120); elementos promotores da levedura ou de outros fungos como o promotor Gal 4, o promotor ADC (álcool des-



-hidrogenase), promotor PGK (fosfoglicerol quinase), promotor da fosfatase alcalina e as seguintes regiões de controlo de transcrição animal que mostram especificidade de tecidos e que têm sido utilizados em animais transgênicos: região de controlo de gene elastase I que é activa em células acinar pancreáticas (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); região de controlo do gene de insulina que é activa em células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122), região de controlo do gene de imunoglobulina que é activa em células linfoides (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), região de controlo do virus do tumor mamário do ratinho que é activa em células testiculares, do colo, linfóides e mastócitos (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), região de controlo de gene da albumina que é activa no fígado (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276), região de controlo de gene da alfa-fetoproteína que é activa no fígado (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58); região de controlo de gene da alfa-1-antitripsina que é activa no fígado (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171), região de controlo de gene da beta-globina que é activa em células mieloides (Mogam et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94; região de controlo de gene de proteína básica de mielina que é activa nas células oligodendrocíticas no cérebro (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); região de controlo de gene da cadeia leve 2 da miosina que é activa no músculo o esquelético (Sani, 1985, Nature 314:283-286) e a região de controlo de gene libertador de hormona gonadotrópico que é activa no hipotálamo (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

As inserções de vectores de expressão contendo o gene do BDNF podem ser identificadas por 3 processos gerais: (a) hibridação ADN-ADN, (b) presença ou ausência de funções "marcadoras" de gene e (c) expressão de sequências inseridas. No primeiro processo, a presença de um gene estranho inserido num vector



de expressão pode ser detectada por hibridação ADN-ADN usando sondas que incluam sequências homólogas às do gene inserido BDNF. No segundo processo, o sistema hospedeiro/vector recombinante pode ser identificado e seleccionado com base na presença ou ausência de certas funções "marcadoras" do gene (p. ex. a actividade da timidina quinase, a resistência a antibióticos, fenótipos de transformação, formação de corpos de oclusão no baculovirus, etc.) causadas pela inserção de genes estranhos no vector. Por exemplo, se o gene do BDNF é inserido dentro da sequência do gene marcador do vector, os recombinantes que contêm a inserção de BDNF podem ser identificados pela ausência da função do gene marcador. No terceiro processo, os vectores de expressão recombinante podem ser identificados avaliando o produto do gene estranho expresso pelo recombinante. Estas avaliações podem basear-se, por exemplo, nas propriedades físicas ou funcionais do produto do gene do BDNF em sistemas de bio-avaliação acima descrito na Secção 5.2..

Uma vez que uma certa molécula de ADN recombinante tenha sido identificada e isolada, podem usar-se diversos métodos já conhecidos na arte para a propagar. Logo que se tenham estabelecido as condições de crescimento e um sistema hospedeiro adequado, os vectores de expressão recombinante podem ser propagados e preparados em quantidades apreciáveis. Como anteriormente se disse, os vectores de expressão que podem ser usados incluem (sem que tal constitua uma limitação) os seguintes vectores ou derivados: virus do homem ou de animais como o vaccinia virus ou adenovirus; virus de insectos como o baculovirus; vectores de levedura; vectores bacteriófagos (p. ex. lambda) e vectores de ADN plasmidico e cosmidico, para nomear apenas alguns.

Além disso, pode escolher-se uma estirpe de célula hospedeira que module a expressão das sequências inseridas ou que modifique e processe o produto de gene da maneira específica pretendida. A expressão de certos promotores pode ser aumentada na presença de certos indutores; assim, a expressão da proteína do BDNF obtida por engenharia genética pode ser controlada. Acontece também que as diferentes células hospedeiras têm



mecanismos característicos e específicos para o processamento da tradução, post-tradução e modificação (p. ex. glicosação, cisão) das proteínas. Podem escolher-se linhas de células ou sistemas hospedeiros apropriados para assegurar a modificação e processamento pretendidos da proteína estranha expressa. Por exemplo, a expressão num sistema bacteriano pode ser usada para produzir um produto de proteína de núcleo não glicosado. A expressão em levedura produzirá um produto glicosado. A expressão em células de mamíferos pode ser usada para assegurar a glicosação nativa da proteína heteróloga do BDNF. Além disso os diferentes sistemas de expressão vector/hospedeiro podem efectuar reacções de processamento tais como cisões proteolíticas de diferentes intensidades.

Num arranjo específico do invento, o ADN codificador da prepro BDNF pode ser clonado em plasmídeo pCMV, amplificado e depois usado para transfectar células COS pelo método do fosfato de cálcio (Chen e Okayama, 1987, Mol. Cell. Biol. 7:2745-2752); a actividade do BDNF pode então ser recolhida de um meio de cultura de células (Ver Secções de Exemplo 10, *infra*).

#### 5.5.1. IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE GENE EXPRESSO

Uma vez identificado o recombinante que expressa o gene do BDNF, pode analisar-se o produto do gene. Isto consegue-se por ensaios baseados nas propriedades físicas ou funcionais do produto.

Identificada a proteína do BDNF, ela pode ser isolada e purificada pelos métodos clássicos como a cromatografia (p. ex., de permuta-iónica, de afinidade e de classificação em coluna), centrifugação, solubilidade diferencial ou por qualquer outra técnica clássica para purificar proteínas. As propriedades funcionais podem ser avaliadas por qualquer ensaio adequado incluindo (mas sem limitação) os gânglios da raiz dorsal do embrião, células retinianas do rato perinatal ou neurónios derivados do placodo neural.

É importante notar que os processos usados para preparar BDNF a partir de tecidos do cérebro, por envolverem, como passo final, a electroforese de gel preparativa, produzem BDNF que não é completamente activo devido à presença de SDS residual (Barde and Thoenen, 1985, in "Hormones and Cell Regulation", Vol. 9, Dumont et al., eds. Elsevier Science Publishers, pp. 385-390). Em contraste o presente invento permite o isolamento do BDNF que é produzido a partir de moléculas de ácidos nucleicos recombinantes e que, estando livre de SDS, possui portanto actividade completa. Por exemplo (e sem limitação), os anticorpos anti-BDNF do invento (p. ex. o anticorpo dirigido contra o fragmento de aminoácidos B5-33 do BDNF porcino, descrito na Secção 11, abaixo) podem ser usados para recolher BDNF recombinante por imunoprecipitação ou por cromatografia de afinidade, produzindo portanto BDNF completamente activo, livre de detergentes.

Num outro arranjo do invento, o prepro BDNF pode ser convertido enzimaticamente em BDNF maduro activo, usando p. ex. a endoproteinase Arg-C (ver Secção de Exemplo 17, abaixo).

#### 5.6. GENES E PROTEÍNAS DO FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO

Usando os métodos referidos acima e os das Secções do Exemplo 6 e 9, abaixo, determinaram-se as seguintes sequências de ácidos nucleicos e deduziram-se as suas sequências de aminoácidos correspondentes. Determinou-se a sequência genómica da ADNc do BDNF do porco representada na Figura 1. Determinou-se a sequência genómica do ADNc do BDNF do homem, representada na Figura 5 que também apresenta as sequências do ADN do porco, rato e frango. Cada uma destas sequências ou os seus equivalentes funcionais podem ser usados de acordo com o invento. Além disso, o invento refere-se aos genes e proteínas do BDNF isolados de porcos, bovinos, felinos, aves, equinos ou caninos, bem como de primatas ou de quaisquer outras espécies onde exista actividade do BDNF. O invento é também dirigido para as subsequências de ácidos nucleicos do BDNF que compreendam pelo menos dez nucleótidos, compreendendo estas subsequências porções hibridáveis da sequência do BDNF que têm aplicação, p. ex., em ensaios de hibridação de



ácidos nucleicos, em análises de mancha Southern e Northern, etc.. O invento fornece também proteína do BDNF e seus fragmentos e derivados, de acordo com as sequências de aminoácidos estabelecidas nas Figuras 1 e 5 ou dos seus equivalentes funcionais. O invento prepara também fragmentos ou derivados das proteínas do BDNF que compreendam determinantes antigénicos ou que sejam funcionalmente activos. Os termos "funcionalmente activos" significam aqui que têm actividade positiva em ensaios de funções conhecidas do BDNF, p. ex. em ensaios nos DRG do embrião do pinto.

Por exemplo, as sequências de ácidos nucleicos representadas nas Figuras 1 e 5 podem ser alteradas por substituições, adições ou eliminações que forneçam moléculas funcionalmente equivalentes. Devido à degenerescência das sequências de codificação de nucleótidos podem ser usadas na prática do presente invento outras sequências de ADN que codifiquem substancialmente as mesmas sequências de aminoácidos representadas nas Figuras 1 e 5. Elas incluem (sem que a tal estejam limitadas) sequências de nucleótidos que compreendam todos ou parte dos genes do BDNF representados nas Figuras 1 e 5 que sejam alterados pela substituição dos diferentes códons que codificam na sequência um residuo de aminoácido funcionalmente equivalente, produzindo assim uma alteração sem sintomas ("silent change"). De igual modo, as proteínas do BDNF ou os seus fragmentos ou derivados, do invento, incluem (sem limitação) aquelas que contêm, como sequência principal de aminoácidos, toda ou apenas parte da sequência de aminoácidos, substancialmente como nas Figuras 1 e 5, incluindo sequências alteradas onde residuos de aminoácidos funcionalmente equivalentes substituem residuos dentro da sequência, do que resulta uma alteração sem sintomas. Por exemplo, um ou mais residuos de aminoácidos dentro da sequência podem estar substituídos por outros aminoácidos de polaridade semelhante que actuam como equivalentes funcionais, do que resulta uma alteração sem sintomas. Os substitutos de um aminoácido dentro da sequência podem ser escolhidos entre outros membros da classe à qual o aminoácido pertence. Por exemplo, os



aminoácidos não polares (hidrofóbicos) incluem a alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina. Os aminoácidos neutros polares incluem a glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina. Os aminoácidos carregados positivamente (básicos) incluem a arginina, lisina e histidina. Os aminoácidos carregados negativamente (ácidos) incluem o ácido aspártico e o ácido glutâmico. Também incluídas no âmbito do invento estão as proteínas do BDNF ou os seus fragmentos ou derivados que sejam modificados diferencialmente durante ou após tradução, p. ex., por glicosilação, cisão proteolítica, ligação a uma molécula anticorpo ou a outro ligando celular, etc..

Além disso, um dado BDNF pode, por mutação in vitro ou in vivo, criar e/ou destruir sequências de tradução, iniciação e/ou de terminação, ou criar variações em regiões de codificação e/ou formar novos locais de endonuclease de restrição ou destruir os já pre-existentes, para facilitar modificações in vitro posteriormente. Pode usar-se qualquer técnica de mutagénese já conhecida na arte, incluindo (sem limitação) a mutagénese in vitro dirigida ao local (Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551), o uso de elos TAB(R) (Pharmacia), etc..

#### 5.7. CRIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO

De acordo com o invento, a proteína do BDNF ou os seus fragmentos ou derivados, podem ser usados como imunogénico para criar anticorpos anti-BDNF. Tentativas anteriores para produzirem uma resposta imune anti-BDNF não tiveram sucesso possivelmente devido às pequenas quantidades disponíveis do BDNF purificado, conseguindo a produção de quantidades relativamente abundantes de proteína do BDNF usando técnicas recombinantes para a síntese da proteína (com base nas sequências de ácidos nucleicos do BDNF do invento), o problema das quantidades insuficientes de BDNF foi ultrapassado.

Para aumentar a probabilidade de produzir uma resposta imune anti-BDNF, pode analisar-se a sequência de aminoácidos do BDNF a



fim de identificar as partes da molécula que podem estar associadas com uma imunogenicidade aumentada. A sequência de aminoácidos pode, p. ex., ser submetida a uma análise por computador para identificar epítomos de superfície, de acordo com o método de Hopp e Woods (1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828) que tem sido aplicado com sucesso para identificar péptidos antigénicos do antígeno de superfície da Hepatite B. Em alternativa, as sequências de aminoácidos do BDNF deduzidas para as diferentes espécies podem ser comparadas e identificadas as regiões relativamente não homólogas; estas regiões não homólogas terão maior probabilidade de serem imunogénicas para as várias espécies.

Para preparar anticorpos monoclonais dirigidos ao BDNF pode usar-se qualquer técnica que produza moléculas anticorpo por cultura de linhas contínuas de células. Por exemplo, a técnica do hibridoma, originalmente desenvolvida por Kohler e Milstein (1975, Nature, 256:495-497), bem como a técnica do trioma, a técnica do hibridoma de células-B do homem (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72) e a técnica do EBV-hibridoma para produzir anticorpos monoclonais no homem (Cole et al., 1985, em "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96) e outras semelhantes estão dentro do âmbito do presente invento.

Os anticorpos monoclonais para uso terapêutico podem ser anticorpos monoclonais do homem ou anticorpos monoclonais quiméricos de homem-ratinho (ou de outras espécies). Os anticorpos monoclonais do homem podem ser preparados por qualquer uma das numerosas técnicas já conhecidas na arte (e.g., Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72-79; Olsson et al., 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16). As moléculas anticorpo quiméricas podem ser preparadas contendo um domínio de ligação antigénica do ratinho com regiões constantes do homem (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, Takeda et al., 1985, Nature 314:452).

Podem ser usados vários processos já conhecidos na arte para



preparar anticorpos policlonais contra epitopos do BDNF. Para a produção de anticorpos, vários animais hospedeiros podem ser imunizados por injeção com proteína do BDNF ou seus fragmentos ou derivados, incluindo (sem limitação) coelhos, ratinhos, ratos, etc.. Podem usar-se vários adjuvantes para aumentar a resposta imunológica, dependendo da espécie hospedeira, incluindo (sem limitação) o reagente de Freund (completo e incompleto), geles minerais como o hidróxido de alumínio, surfactantes como a lisolecitina, poliois plurônicos, polianiões, péptidos, emulsões oleosas, hemocianinas da lapa (genero fissurela) dinitrofenol e adjuvantes potencialmente úteis para o homem como o BCG (Bacilo Calmette-Guerin) e o Corynebacterium parvum.

Um clone molecular de um anticorpo contra um epitopo do BDNF pode ser preparado por técnicas já conhecidas. Pode usar-se a metodologia do ADN recombinante (ver p. ex., Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) para construir sequências de ácidos nucleicos que codifiquem uma molécula de anticorpo monoclonal ou uma sua região de ligação de antígeno.

As moléculas dos anticorpos podem ser purificadas por técnicas já conhecidas, p. ex., por cromatografia de imunoabsorção ou de imunoafinidade, por métodos cromatográficos como a HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) ou por uma combinação destes métodos.

Os fragmentos de anticorpos que contenham o idiótipo da molécula podem ser preparados por técnicas já conhecidas. Por exemplo, esses fragmentos incluem (sem que a tal estejam limitados): o fragmento  $F(ab')_2$  que pode ser produzido por digestão, pela pepsina, da molécula anticorpo; os fragmentos  $Fab'$  que podem ser obtidos por redução das pontes de dissulfureto do fragmento  $F(ab')_2$ , e os fragmentos 2  $Fab$  ou  $Fab$  que podem ser obtidos tratando a molécula do anticorpo com papaina e um agente redutor.

A Secção de Exemplo 11 descreve a preparação de anti-soros policlonais dirigidos contra o fragmento peptídico B5-33 da



proteína do BDNF.

#### 5.8. IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MEMBROS DA FAMÍLIA DE GENES BDNF/NGF

A análise sequencial do gene que codifica o BDNF e a dedução da sua sequência de aminoácidos, revelaram que esta proteína apresenta muitas semelhanças estruturais com o NGF (Figura 2). A sequência principal do BDNF maduro, bem como a estrutura geral e modo provável de processamento de um precursor de proteína, sugerem fortemente que os genes do NGF e BDNF podem ter evoluído de um gene comum ancestral. Na região dos polipéptidos maduros, se se introduzirem apenas 3 intervalos nas sequências do NGF para otimizar a comparação, verifica-se que um total 51 identidades de aminoácidos são comuns às do NGF já conhecidas de muitas espécies e do BDNF do porco e do homem. Estas identidades incluem seis resíduos de cisteína, sugerindo que o NGF e BDNF partilham uma estrutura secundária muito semelhante. Além disso, podem ver-se quatro segmentos de seis ou mais aminoácidos onde o NGF de todas as espécies acima indicadas e o BDNF do porco são idênticas ou diferem por não mais de uma substituição conservadora de aminoácidos. É assim razoável concluir que o NGF e o BDNF parecem ser membros estreitamente relacionados de uma família de genes.

Pode realizar-se uma pesquisa racional de outros membros da família de genes BDNF/NGF, usando uma abordagem que tire vantagem da existência não antecipada de segmentos conservadas de forte homologia entre NGF e BDNF. Por exemplo, podem ser identificados outros membros da família de genes BDNF seleccionados, entre diversas sequências de ácido nucleico, aquelas que sejam homólogas a BDNF e NGF e identificando depois, entre as sequências seleccionadas, aquelas que também contêm sequências de ácidos nucleicos que sejam não-homólogas a NGF e a BDNF. Os termos "não-homólogo" pretendem significar uma região que contenha pelo menos cerca de 6 nucleótidos contíguos onde pelo menos cerca de 2 nucleótidos diferem nas sequências de NGF e BDNF.

Um dos arranjos específicos preferidos do invento apresenta



o seguinte processo. Correspondendo a cada um dos quatro segmentos conservados ("caixas") estabelecidos no Quadro III, infra, podem sintetizar-se conjuntos de sondas de oligonucleótidos degenerados, de pelo menos 18 nucleótidos, representando todas as sequências possíveis de codificação dos aminoácidos encontrados quer em NGF quer em BDNF, para cerca de 6 codões contíguos. Numerando em relação ao terminal amino os polipéptidos maduros (de modo que His 134 do prepro BDNF seja tratado com His 1 na proteína madura), as quatro caixas podem ser caracterizadas do seguinte modo (numeradas em relação às proteínas maduras do homem; sequência do ADN, representada na Figura 1).

QUADRO III

|                 |      |                 | <u>Sequência do ADN</u> |
|-----------------|------|-----------------|-------------------------|
| <u>Caixa 1:</u> | NGF  | Gly10 - Ser19   |                         |
|                 | BDNF | Gly8 - Ser17    | 587-616                 |
| <u>Caixa 2:</u> | NGF  | Lys50 - Cys58   |                         |
|                 | BDNF | Lys50 - Cys58   | 713-739                 |
| <u>Caixa 3:</u> | NGF  | Gly67 - Asp72   |                         |
|                 | BDNF | Gly67 - Asp72   | 764-781                 |
| <u>Caixa 4:</u> | NGF  | Trp99 - Cys110  |                         |
|                 | BDNF | Trp100 - Cys111 | 863-898                 |

Os oligonucleótidos sintéticos, derivados dos pares de sequências das caixas indicadas no Quadro III, podem ser utilizados como iniciadores para amplificar, por PCR, as sequências de uma fonte (ARN ou ADN) de interesse potencial. Isto poderá incluir ARNm ou ADNc ou ADN genómico de qualquer espécie eucariótica que possa expressar um polipéptido estreitamente ligado a BDNF ou NGF. Realizando apenas seis reacções PCR (nomeadamente: um iniciador da Caixa 1 com um iniciador da Caixa 2; Caixa 1 com Caixa 3; Caixa 1 com Caixa 4; Caixa 2 com Caixa 3; Caixa 2 com Caixa 4; Caixa 3 com Caixa 4) pode ser possível detectar um gene ou produto do gene, partilhando quaisquer 2 dos 4 segmentos acima referidos de sequência conservada entre NGF e BDNF. Se alguém decidir sintetizar vários iniciadores degenerados diferentes de cada caixa, pode ser ainda possível realizar uma



pesquisa completa com um número razoavelmente pequeno de reacções PCR. É também possível variar o rigor das condições de hibridação usadas no início das reacções PCR, para permitir maior ou menor grau de semelhança entre as sequências de nucleótidos do gene desconhecido e as de NGF ou BDNF. Se um segmento de um membro, anteriormente desconhecido, da família de genes BDNF/NGF, for amplificado com sucesso, esse segmento pode ser clonado molecularmente e sequenciado, e utilizado como uma sonda para isolar um ADNc completo ou um clone genómico. Este, por sua vez, permitirá a determinação da sequência de nucleótidos completa do gene desconhecido, a análise da sua expressão e a produção da sua proteína para análise funcional.

A abordagem descrita acima tem sido usada para identificar um novo gene relacionado com ambos BDNF e NGF e está descrita na Secção do Exemplo 13, infra.

Além disto, o presente invento apresenta o uso de homologias sequenciais de BDNF/NGF na preparação de novas moléculas recombinantes que sejam membros da família de genes BDNF/NGF mas que não possam ocorrer na natureza. Por exemplo (e não como limitação), pode construir-se uma molécula recombinante, de acordo com o invento, compreendendo porções de genes NGF e BDNF. Tal molécula poderá mostrar propriedades associadas com ambas, NGF e BDNF, e apresentar um novo perfil de actividades biológicas, incluindo não só agonistas como antagonistas. A sequência primária de BDNF e NGF pode também ser usada para prever a estrutura terciária das moléculas, usando a simulação por computador (Hopper e Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 78:3824-3828); os genes recombinantes quiméricos de BDNF/NGF podem ser preparados à luz das correlações entre a estrutura terciária e a função biológica. Podem igualmente ser construídos genes quiméricos compreendendo porções de um qualquer ou mais membros da família de genes BDNF/NGF, incluindo o novo membro descrito na Secção 13.

#### 5.9. UTILIDADE DO INVENTO

O presente invento descreve a preparação da sequência de



ácidos nucleicos do BDNF e da sua proteína, fragmentos peptídicos ou derivados, substancialmente puros. O BDNF pode ser produzido, pela primeira vez, em quantidades suficientes para diagnóstico e aplicações terapêuticas. Igualmente, os anticorpos anti-BDNF, também disponíveis pela primeira vez em consequência do invento, e as sondas de ácidos nucleicos do invento podem ser utilizados no diagnóstico e em aplicações terapêuticas. Para a maior parte dos fins é preferível usar genes do BDNF ou produtos de genes das mesmas espécies para diagnóstico e fins terapêuticos, ainda que a utilização de BDNF de espécies cruzadas possa ser útil em arranjos específicos do invento.

#### 5.9.1. APLICAÇÕES DE DIAGNÓSTICO

O presente invento que se refere a ácidos nucleicos que codificam o BDNF e proteínas, fragmentos de péptidos ou derivados bem como a anticorpos contra a proteína, péptidos ou derivados do BDNF, pode ser utilizado para diagnosticar doenças e distúrbios do sistema nervoso que possam estar associados com alterações do padrão de expressão do BDNF.

Em vários arranjos do invento, os genes da BDNF e suas sequências e subsequências de ácidos nucleicos incluindo sequências complementares podem ser utilizados em ensaios de hibridação para diagnóstico. As sequências de ácidos nucleicos do BDNF, ou as suas subsequências compreendendo cerca de 15 nucleótidos, podem ser usadas como sondas de hibridação. Os ensaios de hibridação podem ser utilizados para detectar, prognosticar, diagnosticar ou monitorizar estados, distúrbios ou doenças associadas com alterações da expressão do BDNF, incluindo em particular, os estados resultantes de danos nos neurónios sensitivos. Estas doenças e estados incluem (sem que a tal estejam limitados) o trauma no SNC, enfarte, infecção, doenças degenerativas dos nervos, estados malignos ou alterações post-operatórias incluindo (mas sem limitação) a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a coreia de Huntington e doenças degenerativas da retina. Por exemplo, pode avaliar-se o ARN total numa amostra de tecido de um paciente pela presença de ARNm do BDNF, onde uma alteração da quantidade de ARNm do BDNF é indica-

dora de degenerescência neuronal.

Têm sido identificados em células do tumor neuroblastoma níveis relativamente elevados de ARNm do BDNF (ver Secção 14, infra, para mais detalhes); assim, num arranjo específico do invento, pode utilizar-se, para a diagnose do tumor neuroblastoma, a detecção de níveis aumentados de ARNm usando sondas de ácidos nucleicos do BDNF. Os níveis extremamente baixos de BDNF sintetizado pela maior parte dos tecidos tornam o ARNm do BDNF um identificador de tumores particularmente útil.

Em outros arranjos do invento podem utilizar-se os anticorpos dirigidos à proteína, fragmentos de péptidos ou derivados do BDNF para diagnosticar doenças e distúrbios do sistema nervoso, incluindo, em particular, os distúrbios sensoriais e doenças degenerativas da retina, bem como os distúrbios e doenças acima referidas. Os anticorpos do invento podem ser usados p. ex. em técnicas de hibridação in situ usando amostras de tecidos obtidas de um paciente necessitado dessa avaliação. Num outro exemplo, os anticorpos do invento podem ser usados em processos ELISA para detectar e/ou medir quantidades do BDNF presentes em amostras de tecidos ou de fluidos; de modo análogo, os anticorpos do invento podem ser usados em análises de mancha Western para detectar e/ou medir o BDNF presente em amostras de tecidos ou de fluidos. Um anticorpo do invento que se liga ao BDNF no ELISA e em manchas Western está descrito na Secção 11, infra.

Noutros arranjos do invento, a proteína, fragmentos de péptidos ou derivados do BDNF podem ser utilizados para diagnosticar doenças e distúrbios do sistema nervoso. Num arranjo particular (e sem limitação), pode ser usada proteína ou fragmento de péptidos marcados para identificar tecidos ou células que expressam o receptor do BDNF com vista a identificar aberrações da expressão do receptor do BDNF e, consequentemente, anormalidades potenciais nos tecidos ou na resposta celular ao BDNF.

#### 5.9.2. APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

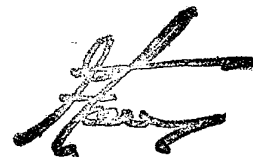
O presente invento que se refere aos ácidos nucleicos que



codificam o BDNF e à sua proteína, fragmentos de péptidos ou seus derivados, bem como a anticorpos dirigidos contra a proteína, péptidos ou derivados do BDNF, pode ser utilizado para tratar doenças e distúrbios do sistema nervoso que possam estar associados a alterações do padrão de expressão do BDNF ou que possam beneficiar da exposição ao BDNF ou a anticorpos anti-BDNF.

Em vários arranjos do invento, a proteína, fragmentos de peptidos ou derivados do BDNF, podem ser administrados a pacientes cujo sistema nervoso tenha sido afectado por trauma, cirurgia, isquémia, infecção, doença metabólica, deficiência nutricional, estados malignos ou agentes tóxicos. O invento pode em particular ser usado para tratar estados em que tenham ocorrido danos aos neurónios sensitivos ou a células do gânglio da retina, por administração de quantidades terapêuticas efectivas de proteína, fragmentos peptidicos ou derivados, do BDNF. Em vários arranjos específicos do invento, o BDNF pode ser administrada localmente a neurónios sensitivos que tenham sido prejudicados incluindo (sem limitação) neurónios nos gânglios da raiz dorsal ou em qualquer dos seguintes tecidos: gânglios geniculado, rochedo e nodoso; o complexo vestibulo acústico do 8º nervo craniano; o polo ventrolateral do lobo maxilo-mandibular do gânglio do trigêmeo, os gânglios do núcleo do trigêmeo do mesencéfalo e os simpáticos. Pode pretender-se administrar os péptidos relacionados com o BDNF ou a proteína do BDNF por adsorção numa membrana, p. ex., uma membrana silástica que pode estar implantada na proximidade do nervo atingido. O presente invento pode também ser utilizado p. ex. para acelerar a recuperação de pacientes que sofram de neuropatias diabéticas, p. ex., mononeuropatias multiplex.

Noutros arranjos do invento, a proteína do BDNF ou os seus fragmentos peptidicos ou derivados, podem ser usados para tratar estados congénitos ou distúrbios neurodegenerativos, incluindo (mas sem limitação) a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, os síndromas Parkinson-Plus (em que os sintomas parkinsonianos resultam da degenerescência de neurónios dopaminérgicos), como a Paralisia Supranuclear Progressiva (Síndrome de Steele-Richardson-Olszewski), a Atrofia Olivopontocerebelosa



(OPCA), Síndrome Shy-Drager (atrofia de sistemas múltiplos) e o complexo de demência de Parkinsonismo Guamiano, e a coreia de Huntington; em particular, o invento pode ser usado para tratar distúrbios congênitos ou neurodegenerativos associados com disfunções dos nervos sensitivos e doenças degenerativas da retina. Por exemplo, a proteína ou fragmentos peptídicos ou derivados do BDNF podem ser usados no tratamento para paraplegia espástica hereditária com degenerescência da retina (síndromas de Kjellin e Barnard-Scholz), retinite pigmentosa, doença de Stargardt, síndrome de Usher (retinite pigmentosa com perda congênita de audição) e síndrome de Refsum (retinite pigmentosa, perda hereditária de audição e polineuropatia), para nomear apenas alguns. É possível que um defeito na síntese ou na capacidade de resposta do BDNF possa ser a etiologia subjacente dos síndromas caracterizados por uma combinação de degenerescência da retina com outra disfunção sensorial.

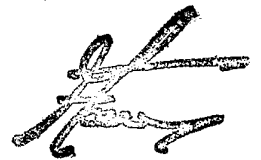
Num arranjo específico do invento, a administração da proteína do BDNF, ou dos seus fragmentos peptídicos ou derivados, pode ser usada em conjunção com implantações cirúrgicas de tecidos no tratamento da doença de Alzheimer e/ou doença de Parkinson. Segundo o que é apresentado nas Secções 12 e 18, infra, o BDNF pode ser usado para melhorar a sobrevivência de neurónios de substância negra dopaminérgicos de modo dependente da dose (Figura 34), o que confirma o uso do BDNF no tratamento de distúrbios nos neurónios dopaminérgicos do SNC, incluindo (mas sem limitação) a doença de Parkinson [particularmente à luz dos resultados apresentados na Secção 21, infra, que mostra que o BDNF pode ser usado para evitar a neurotoxicidade causada pela MPP, uma toxina associada à indução de um síndrome semelhante ao da doença de Parkinson]. Além disso, tem-se observado que o BDNF apoia a sobrevivência de neurónios colinérgicos do SNC (Secções 12 e 16, infra) e em particular os neurónios colinérgicos do prosencéfalo basal, indicando que o BDNF pode ser útil no tratamento de distúrbios que envolvam neurónios colinérgicos incluindo (mas sem limitação) a doença de Alzheimer. Verificou-se que aproximadamente 35% dos pacientes com a doença de Parkinson



sofriam da demência de Alzheimer; o BDNF produzido de acordo com o invento pode provar ser um agente único de terapia útil para este complexo de doenças. De modo análogo, o BDNF, preparado de acordo com o invento, pode ser usado para tratar terapêuticamente a doença de Alzheimer conjuntamente com o Síndrome de Down. O BDNF produzido de acordo com o invento pode ser usado para tratar várias demências bem como distúrbios congênitos de aprendizagem. Verificou-se também que o BDNF parece suprimir a proliferação de células astrogliais, o que recomenda o uso do BDNF para diminuir a formação de cicatrizes no SNC (por exemplo, após cirurgia, trauma ou enfarte) bem como o uso do BDNF no tratamento de tumores no SNC derivados de astrogliais. Ainda num outro arranjo do invento, o BDNF pode ser usado para melhorar a regulação da expressão do receptor de NGF e pode portanto ser usado com vantagem, antes ou concorrentemente, com o NGF, a um paciente necessitado desse tratamento.

Como é indicado na Secção 15, abaixo, a administração de ácido cainico pode ser usada para induzir um aumento da expressão do BDNF (e, em menor extensão, da expressão do NGF) em neurónios, incluindo os neurónios do hipocampo bem como os corticais. Tem-se observado (Secção 15, infra) que a inibição dos receptores, que não do NMDA, bloqueia este aumento, mediado pelo ácido cainico, da expressão do BDNF. Assim, a expressão do BDNF e dos péptidos relacionados com o BDNF, do invento, pode ser induzida in vitro ou in vivo pela administração de ácido cainico ou de compostos relacionados ou carbacol, histamina ou bradiquinina, ou seus compostos relacionados, que se observou terem efeitos semelhantes in vitro ou in vivo ou por agonistas de receptores de glutamato de não-NMDA ou por outras drogas que aumentem ou imitem a acção da acetilcolina, histamina ou bradiquinina. A indução da expressão do NGF pode também ser conseguida pela administração de ácido cainico ou de moléculas relacionadas ou de agonistas de receptores não-NMDA.

Noutros arranjos do invento, a proteína, os fragmentos ou os derivados do BDNF podem ser usados conjuntamente com outras citoquinas para alcançar um desejado efeito neurotrófico. Por



exemplo (e não como limitação), o BDNF preparado pelo invento pode ser usada juntamente com NGF ou com extracto de músculo esquelético para se alcançar um efeito estimulador sinérgico no crescimento de neurónios onde o termo sinérgico significa que o efeito da combinação da proteína, fragmentos peptídicos ou derivados do BDNF, com um segundo agente, alcança um efeito maior do que a substância usada apenas individualmente. Pretende-se que o BDNF possa funcionar sinergicamente com outros factores peptídicos derivados do SNC ainda não completamente caracterizados no crescimento, desenvolvimento, e na sobrevivência duma vasta ordem de subpopulações neuronais do sistema nervoso central.

Prevê-se também que, com base na plena caracterização da molécula do BDNF, possam ser desenvolvidos novos fragmentos de péptidos, derivados ou mutantes do BDNF que sejam capazes de actuar como antagonistas de algumas ou de todas as funções biológicas do BDNF. Estes antagonistas do BDNF podem ser úteis na eliminação selectiva de neurónios sensitivos, p. ex., no tratamento de síndromas de dor crónica.

Ainda noutros arranjos do invento, os anticorpos dirigidos à proteína do BDNF ou aos seus fragmentos peptídicos ou derivados, podem ser administrados a pacientes que sofram de diversos distúrbios e doenças neurológicas e que necessitem de tal tratamento. Por exemplo, os pacientes que sofram de produção excessiva de BDNF podem necessitar desse tratamento. Os anticorpos anti-BDNF podem ser usados para evitar a regeneração anormal de neurónios sensitivos (p. ex. após cirurgia) ou, como acima se discutiu, no tratamento de síndromas de dor crónica. À luz dos elevados níveis do ARNm do BDNF encontrados nos tecidos do neuroblastoma, é possível que o BDNF sirva como um factor de crescimento de tumor autócrino para o neuroblastoma; assim, os anticorpos anti-BDNF podem ser administrados terapeuticamente para, num arranjo específico do invento, se obter a regressão de tumores.



#### 5.10. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

As composições activas do invento, que podem incluir parte ou todo o produto de genes do BDNF, incluindo a proteína, fragmentos de péptidos ou seus derivados ou anticorpos (ou fragmentos de anticorpos) dirigidos contra a proteína, fragmentos de péptidos ou derivados do BDNF ou uma combinação do BDNF e um segundo agente, como o NGF ou o extracto de músculo esquelético podem ser administradas em qualquer veículo estéril farmacêuticamente biocompatível, incluindo (mas sem a tal estarem limitadas) o soro salino, soro salino tamponado, dextrose e água.

A proteína, fragmentos de peptídicos ou derivados do BDNF podem compreender uma sequência de aminoácidos ou uma sua subsequência, substancialmente como se indica na Figura 1 ou Figura 5; pode ser preferível usar proteína do BDNF que compreenda, em particular, parte ou toda a sequência de aminoácidos desde cerca do aminoácido 134 até cerca do aminoácido 252, como se indica na Figura 1, ou uma sequência funcionalmente equivalente, pois que se julga que esta subsequência compreenda a parte funcional da molécula do BDNF. O BDNF pode derivar de sequências que correspondam aos genes de BDNF de quaisquer espécies adequadas incluindo (mas sem limitação) o homem, o porco, o rato, o frango, a vaca, o cão, o carneiro, a cabra, o gato, o coelho, etc..

A quantidade de proteína, fragmentos de péptidos ou derivados do BDNF, ou de anticorpo que sejam eficazes no tratamento de um determinado distúrbio ou estado, depende da natureza do distúrbio ou estado e pode ser determinada pelas técnicas clínicas clássicas. Sempre que possível é desejável determinar a curva de dose-resposta das composições farmacêuticas do invento primeiro in vitro, p. ex. nos sistemas de bioavaliação do BDNF acima descritos, e depois em sistemas úteis de animais modelo, antes de as ensaiar no homem. Com base nos resultados in vitro, num dos arranjos específicos do invento, uma composição farmacêutica eficaz na promoção de sobrevivência de neurónios sensitivos pode fornecer uma concentração local de proteína de BDNF entre cerca de 5 e 25 ng/ml e, de preferência, entre 10 e 20 ng/ml de BDNF.

Num outro arranjo específico do invento, uma composição farmacêutica eficaz na promoção do crescimento e na sobrevivência de neurónios dopaminérgicos ou colinérgicos, poderá fornecer uma concentração local de proteína do BDNF entre cerca de 10 ng/ml e 100 ng/ml.

Os métodos de introdução incluem (sem limitação) o intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, endovenoso, subcutâneo, oral e intranasal. Além disso pode ser desejável introduzir as composições farmacêuticas do invento no sistema nervoso central por qualquer via adequada, incluindo a injeção intraventricular e intratecal; a injeção intraventricular pode ser facilitada por um cateter intraventricular, p. ex., ligado a um reservatório, p. ex. um reservatório Ommaya.

Além disso pode ser desejável administrar as composições do invento, localmente, na área necessitada de tratamento; isto pode conseguir-se, p. ex. e não como limitação, por infusão local durante a operação cirúrgica, por injeção, por meio de um cateter ou por meio de um implante, sendo o referido implante de um material poroso, não poroso ou gelatinoso, incluindo membranas, p. ex. membranas sialásticas ou fibras.

O invento também fornece composições farmacêuticas que compreendem proteínas, fragmentos de péptidos ou derivados do BDNF, administradas via liposomas, micropartículas ou microcápsulas. Em vários arranjos do invento pode ser útil usar essas composições para alcançar uma libertação retardada de BDNF ou de produtos relacionados com o BDNF.

Pretende-se que seja possível introduzir células produzindo activamente o BDNF, substâncias relacionadas com o BDNF, antagonistas do BDNF ou anticorpos anti-BDNF, em áreas necessitadas de concentrações de BDNF aumentadas ou reduzidas.

6. EXEMPLO: A CLONAÇÃO MOLECULAR E A CARACTERIZAÇÃO  
DO ADNc DO FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO  
DE PORCINOS

A extrema raridade da proteína de BDNF nos tecidos impediu o uso das estratégias clássicas de clonação do gene do BDNF. Em vez



disso, utilizando a tecnologia de amplificação do ADN, obtiveram-se alguns resultados sobre a sequência da proteína pelo seguinte modo:

(i) purificaram-se microgramas de BDNF a partir de quilogramas de cérebro de porcos.

(ii) o BDNF purificado foi analisado por técnicas de microsequenciamento de proteína e determinou-se a sequência de aminoácidos de um trecho de 36 resíduos de aminoácidos.

(iii) com base na sequência de aminoácidos determinada em (ii), sintetizaram-se oligonucleótidos que foram usados como iniciadores da reacção em cadeia de polimerase, utilizando o ADNc de colículo superior do porco, como padrão para amplificar o ADN codificador do fragmento de aminoácido definido.

(iv) o produto de reacção do ADN de (iii) foi sequenciado e

(v) sintetizaram-se os oligonucleótidos iniciadores e utilizaram-se na reacção em cadeia de polimerase com o ADNc de colículo superior do porco para criar fragmentos justapostos de ADN representando a montante do ARNm do BDNF bem como a jusante de sequências que codificam o fragmento original de 36 aminoácidos. Depois a região completa de codificação do BDNF do porco foi clonada molecularmente em dois fragmentos justapostos.

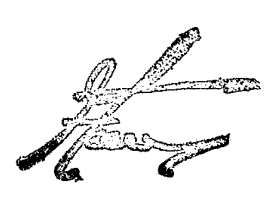
Os pormenores de cada um destes passos, bem como a posterior caracterização do gene do BDNF, estão indicados abaixo.

## 6.1. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1.1. PURIFICAÇÃO DO BDNF A PARTIR DE CÉREBRO DE PORCINOS

A purificação do BDNF a partir do cérebro de porcos foi realizada essencialmente pelo processo estabelecido em Hofer and Barde (1988, Nature 331:261-262).

Seis kg de cérebro de porco foram homogeneizados com um homogeneizador Ultra-Turrax em tampão de fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0, contendo 1 mM de EDTA e, enquanto frescos, foi-lhes adicionado fluoreto de fenilmetanossulfonilo (1 mM) numa propor-



ção de 1 kg de cérebro para 2 l de tampão. Levou-se o pH do sobrenadante até pH 4,0 com HCl 1 N e agitou-se durante 2 h a 4°C. Após centrifugação durante 25 min a 20 000 x g, os sobrenadantes juntos (ajustados até pH 6,0 com NaOH 1 N) correspondentes a 3 kg de cérebro, foram agitados durante 2 h com 1 l de carboximetilcelulose pre-intumescida que tinha sido equilibrada com fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0. Após 2 lavagens com um total de 20 l de fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0, verteu-se a suspensão numa coluna e lavou-se, durante a noite, no mesmo tampão contendo 0,13 M de NaCl. As fracções activas foram eluidas com tampão fosfato contendo 0,5 M de NaCl e depois dialisadas contra 2 x 5 l de fosfato de potássio 5 mM, pH 6,8. As fracções dialisadas, resultantes do processamento de 2 x 3 kg do material inicial, foram aplicadas a uma coluna de hidroxapatite, de volume de leito de 130 ml, que tinha sido previamente equilibrada com fosfato de potássio 5 mM, pH 6,8. A coluna foi então eluída com um gradiente linear de fosfato de potássio, de 500 ml a 5 mM até 500 ml a 700 mM, ambos a pH 6,8, sendo a actividade do BDNF eluída a, aproximadamente, 500 mM, de fosfato de potássio (ver Barde et al., 1982, EMBO J. 1:549-553). Pela adição de fosfato de potássio 1,0 M, as fracções activas, juntas, foram ajustadas até uma molaridade final de fosfato de potássio 700 mM, e aplicadas a uma coluna de 5 ml, de fenil-sefaroze, equilibrada com fosfato de potássio 700 mM, pH 6,8. Depois de lavar com 40 ml do mesmo tampão, a actividade do BDNF foi eluída com fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, dialisada contra água destilada e liofilizada. O material liofilizado foi tomado em tampão de amostra de electroforese em gel com SDS, contendo 0,1% de SDS e sem mercaptoetanol, como se descreve em Barde et al. (1982, EMBO J., 1:549-553), antes de ser aplicado a um SDS+gel constituído por um gradiente linear (mais do que exponencial) de 10 a 25% de acrilamida. Depois de se completar a separação por electroforese, o gel foi rapidamente corado (10 min) com azul de Coomassie, descorado durante 20 min, e uma banda que migrou até ao nível do citocromo C foi retirada e eluída do gel, por electroforese. O SDS foi retirado conforme descrito por Barde et al. (1982, EMBO J., 1:549-553). O processo de purificação que eventualmente



conduziria ao microsequenciamento do BDNF, foi modificado (de acordo com Hofer and Barde, 1988, Nature 331:261-262) e não recorre à electroforese em gel, como último passo da purificação.

#### 6.1.2. SEQUENCIAMENTO DA PROTEÍNA

O BDNF foi quer sequenciado directamente (55 pmole determinado por análise de aminoácidos, com um rendimento inicial de 40 pmole para a histidina do terminal amino) quer cindido do seguinte modo: 5 a 10 µg de BDNF (de 5 preparações diferentes) foram cindidos de acordo com os seguintes processos. Juntou-se V8:1 µg S. aureus V8 (Miles) a 5 µg BDNF em  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  0,2 M, pH 8,0, contendo 10% de acetonitrilo (volume total 50 µl) e incubou-se durante a noite à temperatura ambiente. Tripsina: 1 µg tripsina tratada por TPCK (pâncreas bovino, tipo Sigma XIII) foi adicionado a 8 µg de BDNF em Tris-HCl (0,1 M, pH 8,0) contendo 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (volume total: 40 µl) e incubou-se durante a noite a 37°C. Brometo de cianogénio (CNBr): 10 µg de BDNF foram incubados durante 3 h à temperatura ambiente (volume total: 60 µl) com 10% (p/v) CNBr em 70% (v/v) de ácido fórmico (concentrações finais). Após adição de 500 µl de  $\text{H}_2\text{O}$  no fim da reacção, concentrou-se a amostra até 50 µl em vácuo rápido. Juntaram-se 50 µl Tris-HCl (1,0 M, pH 8,0) juntamente com 5 µl de β-mercaptoetanol e incubou-se a amostra durante a noite a 37°C. Após adição de 5 µl de iodometano evaporou-se a amostra à secura em vácuo rápido. Verificou-se serem necessárias a redução e a alquilação do BDNF após cisão pelo CNBr: não se obtiveram fragmentos sem redução, o que foi revelado por HPLC e por electroforese gel-SDS de Swank Munkres (Swank and Munkres, 1971, Anal. Biochem. 39:462-477). Isto indica que estão presentes pontes de dissulfureto no BDNF, dispostas de tal modo que nenhuma das cisões pode dar origem a péptidos livres. Depois de todas as cisões, as amostras secas foram ressuspensas em ácido trifluoroacético a 0,1% (TFA) e aplicadas a uma coluna de HPLC, C8 microdiâmetro, de fase inversa (Applied Biosystems) e os péptidos foram eluidos a 0,1 ml/min usando um gradiente linear, de 60 min, de 0 a 60% acetonitrilo em 0,1% TFA. A detecção fez-se a 214 nm com um detector U.V. Waters 441. Os péptidos foram sequenciados por degradação automatizada



Edman num microsequenciador de fase gasosa (modelo 470A da Applied Biosystems) de acordo com Hewick (1981, J. Biol. Chem. 256:7990-7997) e Hunkapillar (1983, Methods Enzymol. 91:227-236). A detecção dos aminoácidos PTH fez-se segundo Lottspeich (1985, J. Chromatogr. 326:321-327).

#### 6.1.3. PREPARAÇÃO DE MOLDES DE ADN

Isolou-se ADN genómico do porco, de acordo com o método de Herrmann e Frischauf (1987, Methods Enzymol. 152:180-183).

Para a preparação de ADNc, obteve-se o ARN total de uma amostra de 6 g de colliculus superior de cérebro de porco. O espécimen de tecido foi obtido, dissecado e congelado em azoto liquido num matadouro local. Utilizaram-se métodos clássicos (Okayama et al., 1987, Methods Enzymol. 154:3-28) para extrair o ARN. 80 µg de ARN total foram transcritos com transcriptase inversa do virus de leucémia do murino Moloney (BRL, de acordo com as instruções do fabricante, excepto a adição de 1 µl RNasin e a omissão de actinomicina D), usando a mistura iniciadora CGCATCCGAATTCTGCAGTTTTTTTTTTTTTTT com A, C ou G como nucleótido do terminal 3' (oligo 3, criado para simular um trecho 3' poli-A, contendo locais de reconhecimento de BamHI, EcoRII e PstI).

#### 6.1.4. REACÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE

A reacção em cadeia de polimerase (PCR) foi executada de acordo com o método descrito em Saiki et al. (1985, Science 230:1350-1354).

### 6.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 6.2.1. RESULTADOS DO MICROSSEQUENCIAMENTO DA PROTEÍNA

Os resultados do microssequenciamento da proteína estão apresentados no Quadro IV.



---

QUADRO IV

SEQUÊNCIA DE PÉPTIDOS DO BDNF DETERMINADA EXPERIMENTALMENTE

|            |                    |
|------------|--------------------|
| Terminal N | HSDPARRGELSV       |
| V8         | XVTAADKKTAVD       |
| V8         | KVPVSKGQLKQYFYE    |
| CNBr       | XGGTVTVLEKVP(V)(S) |
| CNBr       | GYTKEGXRGIXRGI     |
| Tripsina   | (T)AVDMSGGTVTVLEK  |
| Tripsina   | ALTMDSK            |

Os aminoácidos da sequência combinada VTAADKKTAVDMSGGTVTV-LEKVPVSKGQLKQYFYE representam sequências codificadas pelos oligonucleótidos iniciadores usados na PCR; ver Secção 6.1.2..

---

Foram determinados quatro segmentos contíguos de sequências de aminoácidos, usando a degradação de Edman que por sua vez poderia ser usada para deduzir a sequência de 36 aminoácidos que representam aproximadamente um terço da sequência inteira de aminoácidos.

6.2.2. SÍNTESE DE OLIGONUCLEÓTIDOS E USO DA PCR PARA  
OBTENÇÃO DO CODIFICADOR DE UM FRAGMENTO DE AMINOÁCIDOS

Os dois oligonucleótidos iniciadores, 17-meros, completamente degenerados, foram sintetizados quimicamente, com base nas sequências codificadoras dos segmentos de 6 aminoácidos perto dos extremos do terminal amino e terminal carboxilo, respectivamente, do fragmento de 36 resíduos de aminoácidos descrito na Secção 6.2.1., supra. Em particular, duas misturas separadas de oligonucleótidos 17-meros (correspondendo a todos os códons possíveis e designados por oligo 1 e oligo 2) baseadas na sequência AADKKT (sentido) e KQYFYE (anti-sentido) (sublinhadas no Quadro IV) foram sintetizadas quimicamente e juntaram-se 150 pmole de cada iniciador a 1 µg do padrão de ADN genómico do porco. Realizaram-se 35 ciclos de amplificação usando a reacção em cadeia de polimerase (PCR) de acordo com as instruções dos fabricantes (GeneAmp™, Perkin-Elmer Cetus). A desnaturação foi a 94°C



durante 1 min, a têmpera do iniciador foi a 45 C durante 2 min e a extensão do iniciador deu-se a 72 C durante 2 min. Cortou-se do gel, a 3%, de agarose (corada com brometo de etídio) uma banda de ADN do tamanho previsto (101 bp) e amplificou-se assimetricamente como descrito por Innis et al. (1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:9436-9440) com um excesso de 100 vezes, quer de oligo 1 quer de oligo 2.

#### 6.2.3. SEQUÊNCIA DE NUCLEÓTIDOS DO FRAGMENTO DE ADNc

Os fragmentos de ADNc resultantes, de sentido e anti-sentido, foram sequenciados pelo método de termina o da cadeia de didesoxinucle t dos (Sanger et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3918-3921) usando, como iniciadores, os oligonucle t dos 1 e 2 com extremos marcados por <sup>32</sup>P. A sequência de nucle t dos observada continha apenas uma estrutura de leitura aberta não interrompida por um c d o de termina o de cadeia. A sequência de amino c dos deduzida para esta estrutura de leitura era completamente consistente com a sequência real de amino c dos determinada para esta região do BDNF porcino.

#### 6.2.4. CLONA O DE TODO O ADNc DO BDNF PORCINO

A região completa de codifica o do BDNF do porco foi clonada molecularmente em dois segmentos justapostos. Para obter a porão 3' (relativa   cadeia de sentido) do ADNc do BDNF, sintetizou-se um oligonucle t do iniciador, de 30-meros, contendo 21 bases da sequência exacta da cadeia do BDNF, de dentro da região acima descrita, para servir como "iniciador de sentido". A sequência de nucle t dos deste iniciador era oligo 4, (5')AAACTAGTCGACGGCAGTGGACATGTCTGGG(3') [o sublinhado indica a sequência correspondente   cadeia de sentido do BDNF, da posi o 643   663 na Figura 1, que codifica a sequência de amino c dos Thr-Ala-Val-Asp-Met-Ser-Gly (as primeiras duas bases do c d o Gly)]. Os nove nucle t dos adicionais no extremo 5' deste iniciador foram includos para fornecer locais convenientes de cisão para a endonucle se de restri o, SpeI e SalI, para uso na clona o molecular. Foi criado um oligonucle t do iniciador, 31-mero, três vezes degenerado, de modo a ser complementar de um trecho de poli-A antecedido de qualquer nucle t do (T, G ou C) na



cadeia de sentido do ADN e a conter locais de reconhecimento para as endonucleares de restrição BamHI, EcoRI e PstI. A sequência deste iniciador "anti-sentido" (oligo 3) foi (5')CGGATCCGAATTCTGCAGTTTTTTTTTTTXX(3'). onde X=A, C ou G. Utilizaram-se oligonucleótidos iniciadores sintéticos para amplificar sequências do ADN do colliculus superior do porco preparadas acima por PCR. Especificamente, o ADN amplificado 3' foi obtido usando 10 µl da reacção de transcrição inversa, 150 pmole do iniciador de sentido (oligo 4) e 150 pmole de oligo 3 como iniciador anti-sentido numa PCR. Realizou-se uma análise de mancha Southern nos produtos de ADN amplificado e a banda que dava um sinal de hibridação com o oligonucleótido AAGGATCCTGCAGTTGGCCTTTTCGAGACGG de extremo marcado com <sup>32</sup>P (oligo 5, usado como iniciador anti-sentido na reacção 5' abaixo descrita e contendo sequências de reconhecimento de BamHI e PstI) foi retirada por corte, extraída pelo método "glassmilk" (gene limpo<sup>TM</sup>, digerido com EcoRI e SalI, clonado num plasmídeo Bluescript SK<sup>+</sup> (Stratagene) e sequenciado).

A fim de obter a restante sequência (da montante da porção 5') de codificação do BDNF, preparou-se ADNc como acima se descreveu e juntaram-se caudas poli-A aos extremos 5', usando transferase de desoxinucleótido terminal. A mesma mistura de três oligonucleótidos, 31-meros, contendo cada um, um trecho de 12 resíduos consecutivos T, acima descritos, foi usada para se obter um iniciador complementar das caudas poli-A adicionadas. Sintetizou-se um único iniciador oligonucleótido, 30-mero, contendo 17 bases correspondente à cadeia complementar da sequência de codificação do BDNF e com locais de reconhecimento das endonucleases de restrição BamHI e PstI. A sequência deste iniciador foi (5')AAGGATCCTGCAGTTGGCCTTTTCGAGACGG(3') (oligo 5, supra; o sublinhado indica a região complementar da cadeia de sentido da sequência codificadora do BDNF, da posição 709 à 693 na Figura 1); isto corresponde ao segmento codificador da sequência de aminoácidos Pro (últimas duas bases do códon)-Val-Ser-Lys-Gly-Gln. Juntaram-se os iniciadores ao ADNc de cauda poli-A e realizou-se a amplificação por PCR como acima. Os



produtos de reacção foram cortados com PstI e clonados no vector Bluescript e determinou-se a sequência de nucleótidos pelo método de terminação da cadeia por didesoxinucleótido.

#### 6.2.5. SEQUÊNCIA DE NUCLEÓTIDOS DO ADNc DO BDNF PORCINO

A sequência de nucleótidos juntos, determinada a partir de clones justapostos de ADNc de BDNF do porco, está indicada na Figura 1, juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida. A sequência compreende uma estrutura de leitura aberta de um polipéptido de 252 aminoácidos. A identificação do códon de arranque Met (ATG) baseia-se na presença de dois códões adjacentes de término de cadeia (TAG-TGA) na mesma estrutura aberta que começam 36 pares de bases a montante. O terminal amino do BDNF porcino, determinado por análise sequencial directa de proteína purificada, corresponde ao residuo His 134 deste polipéptido. Assim, os resultados do sequenciamento mostram que o BDNF maduro deriva do processamento de um polipéptido precursor. O residuo de His 134 é imediatamente precedido pela sequência Arg-Val-Arg-Arg. Estas sequências de um residuo de aminoácido seguido de um residuo neutro e depois mais dois residuos básicos, têm sido consideradas como locais-alvo do processamento proteolítico dos polipéptidos precursores. A sequência de aminoácidos deduzida do BDNF maduro prediz uma proteína de 119 aminoácidos (peso molecular 13 511 daltons) com uma carga básica (pI = 9,99), propriedades que são consistentes com a anterior caracterização do BDNF por avaliação do factor biologicamente activo, após fraccionamento por electroforese bi-dimensional em gel. A sequência de aminoácidos de partes do BDNF, determinada por microsequenciamento de proteína (um total de 64 residuos de aminoácidos) está em completa consonância com a sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleótidos dos clones do ADNc (sublinhado na Fig. 1). A sequência do polipéptido precursor é consistente com o processamento do BDNF em pelo menos dois passos: primeiro, um péptido de sinal de talvez 18 residuos seria cindido a partir do terminal amino, seguindo-se a cisão entre Arg 133 e His 134 para libertar o polipéptido maduro. Se este modelo estiver correcto, então o

precursor poderia ser designado prepro-BDNF.

7. EXEMPLO: O GENE DO BDNF É DISTINTO DO GENE DO NGF EM  
DIVERSAS ESPÉCIES DE VERTEBRADOS

7.1. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1.1. PREPARAÇÃO DE SONDAS DE ADN DO NGF E DO BDNF

Na British Biotechnologies Limited adquiriu-se um plasmídeo contendo um gene sintético codificador do NGF maduro do homem, incorporando a sequência normal codificadora do NGF humano com algumas substituições conservativas de códons para introduzir locais convenientes de cisão de endonucleases de restrição. Sintetizou-se um par de iniciadores oligonucleótidos 18-meros para permitir a amplificação de um segmento, de 270 pares de bases, deste gene, correspondendo à região codificadora para os resíduos de aminoácidos 9 a 11, por PCR. A fim de se obter uma sonda de ADN marcada, realizou-se uma reacção PCR de 10 ciclos, com <sup>32</sup>P-dCTP. Por processos semelhantes obteve-se uma sonda do BDNF, com excepção da amplificação que foi realizada usando ADN genómico, porcino, como padrão original, e o segmento amplificado correspondia à região de codificação dos aminoácidos 28 a 111 do BDNF maduro. Um iniciador de cadeia complementar ("anti-sentido") correspondendo à região de aminoácidos 106 a 111 foi depois sintetizado e tinha a sequência (5')ACATACACAGGAAGTGTC(3'). Preparou-se um iniciador oligonucleótido, de cadeia de sentido, para a região de resíduos de aminoácidos 28-33 [(5')GCAGTGGACATGTCTGGGT(3')]. Realizou-se em condições rigorosas em 2 x SSC, a 68°C, a hidridação de mancha Southern (Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98:503-517) com estas duas sondas.

7.1.2. SEQUENCIAMENTO DE GENES DO BDNF DE VÁRIAS ESPÉCIES

Os mesmos dois oligonucleótidos 18-meros que envolvem a região codificadora para os aminoácidos 28 a 111 do BDNF maduro do porco, acima descritos, foram utilizados como iniciadores para amplificar, sob as condições clássicas da PCR, os segmentos de 252 pares de bases do ADN genómico do porco, rato, frango e homem, e os produtos de reacção de ADN resultantes foram sequenciados pelo método de terminação da cadeia pelo didesoxinucleótido (Sanger et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3918-



-3921). Nalguns casos a banda de ADN amplificada foi retirada por corte e depois extraída por electroforese de gel de agarose e reamplificada antes do sequenciamento. Noutros casos a reamplificação não foi essencial.

## 7.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes do presente invento, apenas tinha sido purificada a proteína do BDNF do porco. Era de extrema importância demonstrar inequivocamente que o BDNF não era simplesmente a subunidade beta do factor de crescimento do nervo (beta-NGF ou aqui simplesmente referida como NGF) do porco, do qual não se conhecia, até à data, a purificação e a clonação molecular. Isto era especialmente crítico pois que as propriedades físicas anteriormente descritas, do BDNF do porco são virtualmente idênticas às do monómero  $\beta$ -NGF de várias espécies. A falta de um anticorpo neutralizador contra o BDNF do porco e o anterior desconhecimento da sequência de aminoácidos ou nucleótidos do BDNF do porco, tornaram impossível determinar a relação exacta entre BDNF e NGF. Era concebível que as diferenças observadas na actividade biológica entre o BDNF e o NGF pudessem, por exemplo, simplesmente reflectir diferenças no NGF entre o porco e certas outras espécies (p. ex. ratinho) ou pudessem resultar da modificação diferencial da molécula da proteína do NGF em diferentes tecidos (p. ex. cérebro de porco versus glândula salivar do ratinho) ou de modificações introduzidas inadvertidamente na proteína nalguns passos da purificação a partir do cérebro de porco.

Se se verificasse que o BDNF era nitidamente distinto do NGF, seria de grande interesse determinar se o gene do BDNF está presente em outras espécies, nomeadamente o homem. Antes do presente invento, não havia informação disponível acerca deste ponto pois que o BDNF era purificado a partir de apenas uma espécie. A presença de actividade neurotrófica aparentemente distinta do NGF em diversos extractos em bruto e em meios condicionados não implicava a existência de uma substância idêntica ou substancialmente equivalente ao BDNF do porco.

A comparação da sequência prevista de aminoácidos do BDNF do



porco com sequências conhecidas do NGF de certas espécies (humana, bovina, cobaia, ratinho, frango e cobra) indicou que o BDNF é significativamente menos relacionado com o NGF de qualquer vertebrado do que os NGF entre si (Figura 2). Uma característica surpreendente da estrutura primária do BDNF maduro é a sua semelhança com a do NGF; com apenas 3 intervalos introduzidos nas sequências do NGF para otimizar a comparação, 51 identidades são comuns aos vários NGF (da cobra ao homem) e ao BDNF (Figura 2). É importante notar que essas partes idênticas incluem todos os 6 resíduos de cisteína. Embora não seja ainda conhecida a disposição exacta das pontes de dissulfureto do BDNF é evidente que essas pontes estão presentes (Quadro III, legenda). Os 3 resíduos de triptofano e 2 de fenilalanina observados no BDNF encontram-se em posições idênticas no NGF. Notamos também que 6 resíduos de ácido aspártico (dos 7 no BDNF) e 7 de valina (dos 9) estão presentes em posições idênticas nos NGFs e BDNF dos mamíferos. Estes 5 aminoácidos constituem cerca de metade das identidades de aminoácidos entre as 2 proteínas. De modo oposto, há algumas diferenças notáveis entre o BDNF e todos os NGFs: além dos 3 intervalos mencionados, há ainda 21 posições em que os aminoácidos são idênticos em todos os NGFs, mas diferentes no BDNF.

A maior parte da sequência do precursor de BDNF não está relacionada com a do NGF, com 2 exceções: a suposta sequência de sinal secretor do BDNF mostra 5 identidades de aminoácidos (dos 18 aminoácidos) e uma chocante relação geral com a sequência de sinal do NGF do ratinho, onde se demonstrou que a cisão ocorre após um resíduo de alanina encontrado na posição 18 depois da metionina de início de tradução (Edwards et al., 1988, Mol. Cell Biol. 8:2456-2464). Parece provável que a alanina, que também se encontra na posição 18 no BDNF, representa um local de cisão potencial para a remoção da sequência de sinal do BDNF. A outra semelhança com o NGF começa na única sequência de consenso de N-glicosação (duplamente sublinhado na Fig. 1), correspondente à asparagina 126. Esta asparagina está localizada 8 aminoácidos antes do local de cisão que dá origem ao BDNF maduro. Encontra-se a mesma disposição em vários NGFs, bem como a sequência Arg-X-



-Básico-Arg, dos últimos 4 aminoácidos do precursor (Schwarz et al., 1989, J. Neurochem. 52:1203-1209).

A prova de que o NGF e o BDNF são codificados por genes distintos, em diversas espécies de vertebrados, foi obtida pela preparação de sondas de ADN a partir de NGF humano clonado molecularmente e do BDNF porcino e pela realização da hibridação da mancha Southern com ADN genómico digerido com a endonuclease de restrição EcoRI. Os ADNs genómicos foram analisados nas seguintes fontes: homem, macaco, rato, ratinho, cão, bovinos, coelho, frango e levedura. O ADN foi digerido com EcoRI e analisado por mancha Southern, sobre filtros em duplicado, com uma sonda de NGF humana, marcada com <sup>32</sup>P e uma sonda de BDNF porcino. Observaram-se bandas simples com cada sonda em todos os organismos analisados excepto na levedura. Na maior parte dos casos, as bandas que hibridam com as sondas de NGF e BDNF em qualquer organismo, eram de mobilidade electroforética diferente, ainda que, nalguns casos (p. ex. ADN do ratinho), os fragmentos EcoRI que hidridam com sondas de NGF e BDNF fossem aproximadamente do mesmo tamanho e não pudessem ser separados nas condições electroforéticas usadas (Figura 3).

Amplificou-se uma porção das sequências codificadoras do BDNF maduro, por PCR, a partir de ADN genómico do porco, rato, frango e homem, e determinaram-se as sequências de nucleótidos. Por análise da sequência de ADN da região amplificada do ADN genómico do porco, confirmaram-se com exactidão os resultados obtidos para a sequência com clones moleculares a partir do ADN do cérebro de porco. Foram também determinadas (Figura 5) as sequências genómicas do BDNF do rato, homem e frango para este segmento de 252 pares de base. No rato e homem a sequência deduzida de aminoácidos para a região (pelo menos) dos aminoácidos 28 a 111, foi idêntica à do BDNF do porco, ainda que se observassem algumas diferenças de nucleótidos (p. ex. alterações conservativas na terceira posição de um códão) entre as várias espécies. No frango observou-se uma única substituição de aminoácidos nesta região; o residuo 61 da proteína do BDNF maduro no frango é a lisina enquanto que é metionina nos BDNF dos



mamíferos. Os resultados da sequência, juntamente com a experiência de hibridação da mancha Southern acima descrita, forneceram prova inequívoca de que o BDNF é codificado por um gene altamente conservado, distinto do que codifica o NGF.

## 8. EXEMPLO: EXPRESSÃO DO ARN DO BDNF EM TECIDOS NEURONAIS VERSUS NÃO NEURONAIS

### 8.1. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 8.1.1. PREPARAÇÃO DO ARN

Extraíu-se ARN total de tecidos de ratinhos, fêmeas, adultos, de acordo com (Okayama et al. (1987, Methods Enzymol. 154:3-28). Resumidamente, o tecido congelado foi homogeneizado em tiocianato de guanidíneo 5,5 M, centrifugou-se o lisado para retirar impurezas e colocou-se o sobrenadante sobre uma camada de trifluoroacetato de cério ajustado até uma densidade de 1,51 g/ml. Após uma centrifugação de 24 h a 125 000 x g num rotor de balança oscilante SW 27 (Beckmann), o ARN foi ressuspensão e precipitado com etanol e acetato de amônio 8 M e guardado a -70°C. A electroforese fez-se de acordo com Lehrach et al. (1977, Biochemistry 16:4743-4751) sobre geles de 1,3% agarose-formaldeído. O ARN foi transferido para membranas de nylon (Hybond-N, Amersham) e hibridado durante a noite, a 62°C, em 1 ml de 2 x SSC contendo 50% formamida, com uma sonda de BNF de ratinho com ARNc marcado por  $^{32}\text{P}$  ( $10^7$  cpm, ver abaixo). Lavou-se durante 60 min a 65°C, em 0,1 x SSC. Após lavagem incubou-se a mancha durante 60 min à temperatura ambiente com 0,1 µg/ml de RNase A (Pharmacia) e expôs-se o filme a -70°C (com filtro intensificador) durante 48 h.

#### 8.1.2. PREPARAÇÃO DA SONDA DE ARNc

Pesquisou-se uma biblioteca de ADNc de cérebro de ratinho, com 2 oligonucleótidos de BDNF independentes. Isolaram-se dois clones duplos que foram subclonados no local EcoRI de um plasmídeo SK<sup>+</sup> (Stratagene). Determinou-se a sequência de nucleótidos correspondentes aos nucleótidos 350 a 829 da sequência do porco (ver Fig. 1). Nesta sequência encontrou-se um total de apenas 4 aminoácidos de diferença entre o BDNF do ratinho e o do porco, o que indica um notável grau de conservação deste domínio

entre o BDNF do porco e do ratinho. Preparou-se uma sonda de ARN de uma só espira usando este padrão e a plimerase T3 (Promega). A actividade especifica desta sonda era de  $10^8$  cpm/ $\mu$ g.

## 8.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizou-se a análise de mancha Northern para avaliar a expressão do ARNm do BDNF em tecidos neuronais versus não neuronais. As análises de mancha Northern foram realizadas usando tecidos de ratinho o que permite um processamento de extracção de ARN mais rápido do que em tecidos de porco. Uma sonda  $^{32}\text{P}$ -ARNc detectou um sinal a cerca de 1,45 kb no cérebro (Fig. 4) e na espinal medula (resultados não apresentados). Significativamente, não foi detectado nenhum sinal em qualquer outro tecido incluindo rins, intestinos, pulmões, fígado, baço, coração e músculos (Fig. 4). Assumindo que o tamanho do ARNm do porco seja semelhante ao do ratinho, a sequência de ADNc indicada na Figura 2 representa mais de 80% da sequência completa de ARNm.

Uma observação significativa no estabelecimento da fisiologia do BDNF é a de que a codificação do ARNm para esta proteína foi apenas encontrada no sistema nervoso central e não em 7 tecidos que não pertencem ao SNC. Encontrou-se ARNm de BDNF não apenas no cérebro total (Fig. 4) mas também na espinal medula e no colliculus superior (a sequência apresentada na Figura 1 deriva inteiramente de um padrão de ADNc<sup>de</sup>/colliculus superior). Estes resultados conformam a ideia de que o BDNF é um factor neurotrófico derivado do alvo e que os neurónios que respondem ao BDNF são intrínsecos do SNC ou directamente relacionados com as estruturas do SNC. De facto, todos os neurónios que até aqui se sabe responderem ao BDNF ou se projectam no SNC, como a raiz dorsal ou os gânglios sensitivos cranianos (Lindsay et al., 1985, Dev. Biol. 112:319-328; Davies et al., 1986, J. Neurosci. 6:1897-1904), ou são neurónios do SNC como as células do gânglio da retina (Johnson et al., 1986, J. Neurosci. 6:3031-3038). É evidente que são necessários estudos pormenorizados para examinar a distribuição exacta dos locais de síntese do BDNF no SNC, mas já é claro que a distribuição do ARNm do BDNF é muito diferente da do ARNm do NGF encontrada em muitos tecidos que não pertencem

ao SNC (Heumann et al., 1984, EMBO J. 3:3183-3189; Shelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:7951-7955).

## 9. EXEMPLO: CLONAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DO BDNF DO HOMEM E DO RATO

### 9.1. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 9.1.1. BIBLIOTECAS GENÓMICAS DE ADN E ADNc

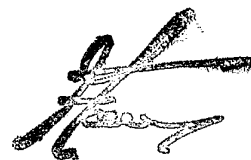
Obteve-se, a partir de Stratagene, uma biblioteca de ADNc da retina do homem adulto, em lambda-ZAPII. Obteve-se, a partir de Clontech, uma biblioteca de ADN genómico da placenta humana, em EMBL3/SP6/T7. Obteve-se, a partir de Clontech, uma biblioteca de ADNc do cérebro de feto humano, em gt11. Obteve-se, a partir de Clontech, uma biblioteca de ADN genómico do rato, em EMBL3/SP6/T7. Ambas as bibliotecas genómicas foram preparadas por digestão parcial de ADN genómico com endonuclease de restrição Sau 3A e ligação no local Bam HI do vector. Obteve-se, a partir de Stratagene, uma biblioteca de ADNc de cérebro de rato em lambda-ZAPII.

#### 9.1.2. PREPARAÇÃO DE SONDAS DE ADN DO BDNF

Prepararam-se sondas de ADN de BDNF marcadas com <sup>32</sup>p usando os mesmos oligonucleótidos iniciadores descritos na Secção 7.1.1., supra, na PCR com ADN genómico humano com vista a amplificar a região codificadora dos resíduos 28-111 do BDNF humano. Em paralelo, obteve-se uma sonda específica do BDNF do rato, marcada com <sup>32</sup>p, usando ADN genómico do rato como padrão para a PCR.

#### 9.1.3. PESQUISA DE BIBLIOTECAS

As bibliotecas de fago lambda foram pesquisadas de acordo com métodos clássicos (Benton and Davis, 1977, Science 196:180-182; Maniatis et al., 1978, Cell. 15:687-701), hibridando em 50% formaldeído com sulfato de dextrano e solução de Denhardt a 42°C. Os filtros foram pre-hibridados a 42°C em 50% formamida, 5XSSCPE, solução a 10% de Denhardt, 0,5 mg/ml de ADN de esperma de salmão, 0,1% SDS e 10% dextrana-sulfato. A hibridação realizou-se no mesmo tampão, excepto na solução de Denhardt que era a 2%, no ADN de esperma de salmão que era a 0,1 mg/ml, e no SDS e dextrana-sulfato que foram omitidos. Depois lavaram-se os filtros de



hibridação a 68°C. Usou-se a sonda de BDNF humano para pesquisar as bibliotecas de ADN genómico humano e ADNc da retina; a sonda de BDNF do rato foi usada para pesquisar bibliotecas de ADN genómico e de ADNc do cérebro do rato. As bibliotecas foram também pesquisadas com sondas de NGF do homem e do rato, preparadas como se descreveu na Secção 7.1.1. supra.

## 9.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De cada biblioteca foram pesquisadas pelo menos 670 000 placas. Os clones positivos humanos foram considerados serem os que hibridavam com a sonda de BDNF humano, mas não com a sonda de NGF humano acima descrita. Obtiveram-se clones genómicos de BDNF, tanto de bibliotecas do homem como do rato, a uma frequência consistente com a representação do gene do BDNF, a uma cópia por genoma haploide. De ambas as bibliotecas genómicas, do rato e do homem, foram pesquisadas aproximadamente um milhão de placas. Obtiveram-se três positivas da biblioteca genómica do rato e uma da biblioteca genómica do homem. Obtiveram-se clones positivos das bibliotecas de ADNc do cérebro do rato e da retina do homem, a uma frequência consistente com um gene expresso a níveis muito baixos; no ADNc do cérebro do rato foram identificados 2 positivos em 670 000; na biblioteca de ADNc da retina do homem, identificou-se um em 670 000 clones. Não foram detectados clones positivos entre 670 000 de uma biblioteca comercial de ADNc preparada a partir de cérebro de feto humano. O sequenciamento de nucleótidos foi realizado em clones genómicos e em ADNc do BDNF humano, usando oligonucleótidos iniciadores sintéticos representando sequências exactas de dentro da região codificadora do BDNF do homem e do rato, como se determinou na Secção 7.1.2. supra. O clone de ADNc, humano, mais comprido, que se obteve tinha uma inserção de aproximadamente 1,6 a 1,8 kbp e, como se esperava, continha a sequência exacta da porção do BDNF humano determinada após amplificação directa do ADN genómico humano, como se descreveu na Secção 7.2., supra. A análise detalhada da sequência deste clone de ADNc (Figura 5) revelou uma estrutura de leitura aberta codificando um polipéptido de 247 aminoácidos, semelhante, mas não idêntica, a todo o comprimento do precursor



de BDNF do porco. Dentro da região correspondente ao polipéptido do BDNF maduro (p. ex. entre o códon de His 134 e o códon de terminação da cadeia) não se encontraram diferenças na sequência deduzida de aminoácidos; todas as substituições de nucleótidos entre porco e homem eram conservativas em relação à especificidade de codificação. O restante do suposto polipéptido precursor do BDNF mostrou algumas diferenças na sequência de aminoácidos entre homem e porco, e, o que é verdadeiramente notável, a ausência, no gene de BDNF humano, de 5 entre 6 códões consecutivos Ser observados no porco, de que resulta um polipéptido ligeiramente mais curto (247 versus 252 aminoácidos).

As bibliotecas preparadas no vector EMBL3 têm inserções entre 10 e 23 kbp de ADN estranho. O tamanho exacto da inserção no clone do BDNF genómico humano analisado em detalhe não foi determinado. Contudo, o clone continha um único fragmento de endonuclease de restrição EcoRI de aproximadamente 4 kbp que hibridava com a sonda marcada de BDNF usada para pesquisar a biblioteca. Este fragmento tem o tamanho esperado, baseado nos resultados da hibridação de mancha Southern do ADN genómico humano com a sonda de BDNF porcino acima descrita. Efectuou-se a análise sequencial do clone humano, usando oligonucleótidos sintéticos representando a sequência de ADNc para preparar a síntese do ADN a partir do molde de ADN bacteriófago. O sequenciamento da sequência de codificação do suposto precursor do BDNF humano foi considerado idêntico ao do clone de ADNc humano, com excepção de uma só substituição de nucleótido na região prepro, correspondente a uma substituição de aminoácido de metionina (ATG) em vez de Valina (GTG), no nucleótido 785, na Figura 5. Esta alteração pode reflectir um polimorfismo no genoma humano. Tal como no caso do gene do NGF humano, não se detectaram sequências intermédias dentro da sequência de codificação do suposto prepro BDNF humano. Informação sobre a sequência do ADNc do rato está também apresentada na Figura 5.

## 10. EXEMPLO: EXPRESSÃO DO BDNF RECOMBINANTE

### 10.1. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 10.1.1. PREPARAÇÃO DE UM VECTOR DE EXPRESSÃO DO BDNF

Obteve-se a sequência correspondente ao prepro BDNF do porco usando os oligonucleótidos iniciadores (150 pmole cada)

ATAATCTAGATGACCATCCTTTTCCTT (sentido)

ATAATCTAGACTATCTTCCCCTCTTAAT (ANTISENTIDO) numa PCR usando 1 µg de molde genómica de porco (cada iniciador tem um local XbaI adicionado). A reacção de amplificação foi como se descreveu, excepto na temperatura de têmpera que foi de 50°C. Após digestão com XbaI, o ADN amplificado foi ligado ao local XbaI do plasmídeo pCMV<sup>1</sup> para dar pCMV<sup>1</sup>-pBDNF<sup>-1</sup> (-1 indica o sentido de orientação na Figura 6 e corresponde a COS+ no Quadro V) e introduziu-se o plasmídeo na bactéria XL-1 por electroporação.

#### 10.1.2. EXPRESSÃO DO BDNF EM CÉLULAS COS

O ADN do plasmídeo pCMV<sup>1</sup>-pBDNF de clones positivos (verificados por hibridação com oligo 5, Fig. 2) foi cortado tanto com XbaI como com PstI. O tamanho dos produtos resultantes permitiu-nos determinar a orientação das inserções e ambos os plasmídeos foram usados para transfectar células COS pelo método do fosfato de cálcio (Chen et al., 1987, Mol. Cell Biol. 7:2745-2752), e recolheu-se o meio de crescimento após 24 h. A actividade do BDNF foi avaliada por bioensaio no gânglio da raiz dorsal do embrião do pinto, como acima se discutiu em detalhe.

### 10.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Colocaram-se em placa (6 000 por poço) neurónios sensitivos da espinha do pinto E8, incubaram-se durante 24 h e contaram-se após 24 h (Lindsay et al., 1985, Develop. Biol. 112:319-328). Os valores são as médias de determinações em triplicado ± desvio padrão. O BDNF e o NGF foram usados a 1 ng/ml, concentração à qual se observou, com qualquer dos factores, sobrevivência máxima. COS+ refere-se a células transfectadas com plasmídeos contendo a inserção de BDNF com orientação de "sentido"; COS- refere-se a células transfectadas com plasmídeos contendo as inserções de BDNF na orientação inversa; COS refere-se a células não transfectadas. Em diluições acima de 1:20 observou-se não

haver sobrevivência, acima do controlo, quer com o meio condicionado de COS- quer com o de COS. Em todas as experiências sem NGF, usou-se um anticorpo anti-NGF, monoclonal, a 1 µg/ml (Korsching et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:3513-3516).

Como se indica no Quadro V, só o meio obtido de culturas de células COS portadoras do plasmídeo pCMV1-pBDNF com orientação de sentido, estava associado à sobrevivência, acima dos valores do controlo, dos neurónios sensitivos do pinto. O BDNF recombinante é portanto biologicamente activo. Além disto, a adição de BDNF isolado do cérebro do porco não aumentou a sobrevivência dos neurónios sensitivos, de modo significativo, acima dos níveis de sobrevivência resultantes do BDNF recombinante usado sózinho, o que indica que o BDNF recombinante é capaz de saturar os receptores de BDNF. Verificou-se também que o BDNF recombinante tem um efeito aditivo ou sinérgico na promoção da sobrevivência dos neurónios sensitivos do pinto quando usado conjuntamente com o NGF.

#### QUADRO V

##### SOBREVIVÊNCIA DE CULTURAS DE NEURÓNIOS SENSITIVOS DO PINTO

| meio COS (diluição final) | 1:20   | 1:50      | 1:200     |
|---------------------------|--------|-----------|-----------|
| COS+                      |        | 2.510±263 | 2.833±171 |
| COS-                      | 211±16 |           |           |
| COS                       | 250±87 |           |           |
| BDNF + COS+               |        | 2.516±209 |           |
| NGF + COS+                |        | 5.770±72  |           |
| <hr/>                     |        |           |           |
| BDNF sozinho              |        | 2.718±424 |           |

#### 11. EXEMPLO: OBTENÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O BDNF

##### 11.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Preparou-se um anti-soro policlonal específico para o BDNF, designado por "sera 4", num coelho branco NZ por imunização com um péptido sintético.

#### 11.1.1. SÍNTESE DE PÉPTIDOS E LIGAÇÃO A UM SUPORTE

Sintetizou-se, por processos convencionais, um péptido constituído por 34 resíduos de aminoácidos, designado por B5. Tem a seguinte sequência de aminoácidos, correspondente a 33 resíduos de BDNF maduro (resíduos 153 a 185 da sequência do prepro DNF completo do porcino, indicada na Figura 1), com um resíduo adicional de cisteína no terminal amino (indicado a itálico) para permitir a ligação a uma proteína de suporte usando o ácido m-maleimidobenzóico-N-hidroxi-succinimida (MBS):

Cys-Val-Thr-Ala-Ala-Asp-Lys-Lys-Thr-Ala-Val-Asp-Met-Ser-  
-Gly-Gly-Thr-Val-Thr-Val-Leu-Glu-Lys-Val-Pro-Val-Ser-Lys-  
-Gly-Gln-Leu-Lys-Gln-Tyr

O péptido B5 foi ligado a albumina de soro bovino (BSA) usando bis-diazo-benzidina (BDB). A BDB fresca foi preparada dissolvendo 46 mg de benzidina-HCl (p-diaminodifenil-HCl, obtida da Sigma) em 9,0 ml de HCl 0,2 N. Dissolveram-se 35 mg de NaNO<sub>2</sub> em 1 ml de H<sub>2</sub>O e juntou-se à solução de benzidina, agitando durante 1 h a 4°C. Dissolveram-se 21 mg de BSA em 3,0 ml de borato 0,16 M, NaCl 0,13 M, pH 9,0. Dissolveram-se aproximadamente 15 mg do péptido B5 em 1,5 ml de tampão borato-NaCl, pH 9,0. Juntou-se a solução peptídica à solução de BSA e colocou-se em gelo. Juntou-se 1,0 ml de BDB à solução BSA-péptido e incubou-se a mistura reagente, sob agitação, durante 2 h a 4°C; o pH foi controlado e mantido na zona dos 9,0 pela adição de pequenas quantidades de NaOH 0,5 M conforme necessário. A reacção terminou pela adição de 0,2 ml de uma solução tamponada com 1% de fenol. Removeram-se os reagentes em excesso, por diálise contra soro salino tamponado com fosfato (PBS).

#### 11.1.2. IMUNIZAÇÃO

Um total de seis coelhos foram imunizados de acordo com o seguinte protocolo:

coelhos 1 e 4 - péptido B5 ligado no seu terminal C a BSA, usando BDB;

coelhos 2 e 3 - péptido B5 ligado no seu terminal N a BSA, usando MBS;



coelhos 5 e 6 - péptido B5 misturado com nitrocelulose em pó.

Em todos os casos, a primeira imunização usou 1 mg de imunogénio (100 µg B5/500 µg nitrocelulose para os coelhos 5 e 6) em 0,5 ml PBS mais 0,5 ml de adjuvante completo de Freund. A mistura foi injectada subcutaneamente em múltiplos locais nas costas. A segunda imunização realizou-se três semanas mais tarde e foi idêntica à primeira excepto em ter-se usado adjuvante incompleto de Freund em vez do adjuvante completo de Freund. Doses subsequentes de reforço ocorreram a intervalos de 4 a 6 semanas. Os coelhos foram sangrados 1 semana após imunização e os anti-soros foram rotineiramente verificados quanto à ligação ao péptido puro B5, pela avaliação imunoadsorvente com enzima ligado (ELISA).

#### 11.1.3. DETECÇÃO DA LIGAÇÃO DO ANTICORPO AO BDNF

Juntaram-se 100 µg de antígeno (péptido B5) em H<sub>2</sub>O aos poços de uma placa de microtitulação e deixou-se secar durante a noite, depois lavaram-se brevemente com H<sub>2</sub>O e bloquearam-se com 100 µg de gelatina a 1% durante 30 min à temperatura ambiente. Os poços foram lavados três vezes com água destilada e depois juntaram-se 100 µg de anti-soro e deixou-se incubar a 4°C durante a noite. Os poços foram depois lavados três vezes em PBS/0,05% triton X-100, após o que se juntaram 100 µg do imunoensaio anti-coelho marcado com peroxidase (1/1000 de diluição) e incubaram à temperatura ambiente durante 3 h. Lavaram-se os poços duas vezes, juntaram-se 100 µg de solução ABTS (10 mg ABTS (Sigma) dissolvidos em 10 ml Na citrato 0,1 M, pH 4,0 mais 10 µg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e incubaram-se durante cerca de 5 minutos, até desenvolvimento da cor. Parou-se a reacção pela adição de 10 µg de NaN<sub>3</sub> a 1%. As amostras foram diluídas a 1:5 com H<sub>2</sub>O e mediu-se a densidade óptica a 415 nm.

#### 11.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O anti-soro do coelho 4 (sera 4) mostrou o título mais elevado (Figura 7a) e foi utilizado nas experiências seguintes. Os anticorpos do sera 4 foram parcialmente purificados por precipi-

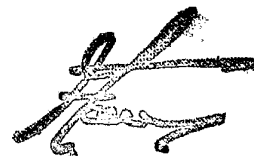


tação com sulfato de amónio; a uma porção de anti-soro juntou-se lentamente um volume igual de sulfato de amónio saturado, sob agitação, e agitou-se a solução por mais 15 minutos, depois centrifugou-se a 2 000 x g. O peletizado foi lavado duas vezes em sulfato de amónio 50% saturado, depois redissolveu-se em PBS num volume correspondente ao volume original do soro. Removeu-se o sulfato de amónio por diálise contra diversas mudanças de PBS. A solução dialísada foi dividida em alíquotas de 1,0 ml e submetida a liofilização usando vácuo rápido. Uma amostra de anticorpo sera 4 foi ressuspensa em 0,5 ml H<sub>2</sub>O, verificada a sua reactividade com o péptido B5, por ELISA, e constatou-se que reagia a uma diluição de 1:4000.

Foram preparados anticorpos policlonais contra um péptido sintético (B5) correspondente a um fragmento de 33 aminoácidos do BDNF do porco, por imunização de coelhos como acima se descreveu. O sera 4 que mostrou ter o título mais elevado contra o péptido sintético, mostrou reactividade com o BDNF purificado de cérebro porcino, pelo ELISA (Figura 7b). Também se notou uma fraca reactividade por imuno-manchar (Resultados não indicados). Contudo, o anti-soro foi incapaz de bloquear a actividade do BDNF numa avaliação biológica sobre neurónios sensitivos do gânglio da raiz dorsal do embrião do pinto.

## 12. EXEMPLO: NOVOS EFEITOS BIOLÓGICOS DO BDNF

As seguintes observações indicam que o BDNF é capaz de (i) ajudar a sobrevivência e induzir o estado completamente diferenciado dos neurónios dopaminérgicos do SNC; (ii) ajudar a sobrevivência de neurónios colinérgicos do SNC; e (iii) suprimir a proliferação de células astrogliais. Estes efeitos biológicos do BDNF nunca foram descritos anteriormente. Como os neurónios dopaminérgicos, neurónios colinérgicos e células astrogliais podem, cada um, estar associados a doenças ou distúrbios neurológicos, o BDNF pode provar ser útil no tratamento de neuropatologias envolvendo estas populações de células.



## 12.1. MATERIAIS E MÉTODOS

### 12.1.1. MÉTODOS DE CULTURA DE NEURÓNIOS DOPAMINÉRGICOS DE SUBSTANCIA NEGRA

O mesencéfalo ventral foi dissecado a partir de cérebros de embriões de ratos, de idade variando entre o 13º dia embrionário até ao 15º dia embrionário. Normalmente usaram-se 2 litros em cada experiência. A solução de dissecação tinha a seguinte composição: NaCl, 136,8 mM; KCl, 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 8,0 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 mM; glucose 6 mg/ml e BSA, 0,1 mg/ml, pH 7,4. Esta solução foi preparada e depois esterilizada por filtração por um filtro de poro 0,2 µ. A dissecação foi realizada em condições não estéreis. Uma vez o tecido dissecado de todos os cérebros, o restante processo foi realizado em condições estéreis. Os fragmentos de tecidos foram colocados numa placa de cultura, de 35 mm, e cortado com uma tesoura afiada. Juntaram-se então 2 ml de meio nutriente F-12 contendo 0,125% tripsina e incubaram-se a 37°C. No fim deste período de incubação, juntou-se DNase I à suspensão de modo tal que a concentração final fosse de 80 ng/ml. Realizou-se uma outra incubação idêntica e à suspensão de tecido juntou-se depois 8,0 ml de meio de crescimento constituído por Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 2 mM glutamina, 6 mg/ml glucose, 5 unidades/ml penicilina, 5 mg/ml estreptomicina e 7,5% soro de feto de vitelo (FCS). Centrifugou-se a amostra numa centrifuga de bancada, à temperatura ambiente, a 500 rpm durante um período de 5 min. Aspirou-se o meio e juntaram-se 2 ml de meio de crescimento ao pelletizado de células. Usou-se uma pipeta aperfeiçoada ao fogo, com uma abertura de 1 mm, para triturar as células por 8 vezes. Os restantes fragmentos de tecido foram deixados assentar por gravidade e tomou-se uma pequena aliquota do sobrenadante para avaliar o número de células por contagem num hemocitómetro. Depois de determinada a densidade celular, colocaram-se as células em placas de cultura de tecidos a uma densidade de 50 000/cm<sup>2</sup>.

Prepararam-se placas de cultura no dia anterior ao da dissecação. As placas de tecidos (24 poços, 2 cm<sup>2</sup>/poço) foram pre-revestidos com poliornitina (peso molecular 30 000 - 70 000

g/mol) a 0,5 mg/ml, à temperatura ambiente, durante 3 h. As placas foram muito bem lavadas com água e depois tratadas com laminina de ratinho, 5 µg/ml, à temperatura ambiente, durante 3 h. Lavaram-se então as placas com água, como acima, e incubaram-se durante a noite a 37°C numa atmosfera humidificada constituída <sup>por</sup> 5% CO<sub>2</sub>, 95% ar, na presença do meio de crescimento. No dia seguinte o meio foi retirado das placas e substituído por meio de crescimento fresco.

Uma vez postas as células nas placas de cultura, colocaram-se estas num incubador a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub>/95% ar durante um período de 24 h. Mudou-se o meio de cultura para uma formulação sem soro (SFM=serum-free medium) com a seguinte composição: uma mistura 1:1 (v/v de Basal Eagle Medium (BEM) e mistura nutriente F-12 com glucose (33 mM), glutamina (2 mM), NaHCO<sub>3</sub> (15 mM), HEPES (10 mM), suplementado com insulina (25 µg/ml), transferrina (100 µg/ml), putrescina (60 µM), progesterona (20 nM), selenito de sódio (30 nM), penicilina (5 U/ml), estreptomicina (5 mg/ml) e T<sub>3</sub> (30 nM). Nalgumas experiências juntou-se BDNF purificado às culturas, depois da mudança do meio para SFM no 2º dia de cultura.

Prepararam-se soluções para cultura de neurónios dopaminérgicos usando água tirada de um "Milli-Q reagent water system". As formulações do meio de cultura dos tecidos foram obtidas de Gibco Laboratories (Santa Clara, California), bem como o soro de feto de vitela (lote Nº. 43N1086) e a laminina de ratinho. Todos os outros componentes dos meios foram adquiridos na Sigma Chemical (St. Louis, MO) e eram de grau "verificado com culturas de células". A poliornitina e a DNase I foram também obtidas na Sigma. A tripsina foi obtida no Wothington (Freehold, NJ), lote Nº. 3667. Os produtos químicos comerciais eram de grau analítico, comprados na Baker Chemical (Phillipsburg, NJ). O BDNF usado nestas experiências foi purificado a partir de cérebro de porco pelo Dr. Y.-A. Barde, de acordo com o processo de Barde et al., 1982 (supra).

12.1.2. MÉTODOS PARA COLORAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DE  
CULTURAS DE MESENCÉFALO VENTRAL

Prepararam-se soluções fixadoras frescas para cada experiência. Para a coloração da tirosina-hidroxilase (TH) o fixador foi 4,0% formaldeído em tampão fosfato de Sorenson. O tampão de Sorenson foi preparado juntando uma solução 0,2 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M até o pH alcançar 7,3. Juntou-se depois paraformaldeído à solução e aqueceu-se por pouco tempo para permitir dissolvê-lo, e arrefeceu-se até à temperatura ambiente antes de ser usado.

Para iniciar o processo, retirou-se o meio de cultura das placas de cultura por sucção suave e juntou-se com cuidado às placas a solução fixadora adequada. Efectuou-se, durante 20 min, a incubação à temperatura ambiente. Seguiram-se três lavagens em tampão de fosfato de Sorenson, de 5 minutos cada, com rotação suave. As células foram então incubadas numa solução de têmpera, durante 30 min., à temperatura ambiente, com rotação branda. A solução de têmpera das culturas a serem coloradas pela TH consistiu em tampão de fosfato de Sorenson contendo 2% de soro normal de cavalo. A seguir incubaram-se as culturas em tampão de permeabilização à temperatura ambiente durante 30 min sob rotação branda. Para as culturas a serem coloradas pela TH, a solução era constituída pelo tampão de Sorenson contendo 0,2% saponina e 1,5% soro normal de cavalo. Depois da etapa de permeabilização, incubaram-se as culturas na presença de anticorpo primário, durante a noite, a 4°C. O anticorpo contra a TH do rato foi um anticorpo monoclonal de ratinho, do isotipo IgG2a. Foi usado a 40  $\mu\text{g/ml}$  numa solução de 10 mM  $\text{NaPO}_4$ , 50 mM NaCl, 0,2% saponina, pH 7,5. Depois da incubação com o anticorpo primário, lavaram-se as culturas por 5 vezes, de 15 min cada, no tampão de permeabilização adequado. A seguir, incubaram-se as culturas com anticorpo secundário conjugado com biotina, isto é, IgG anti-ratinho, de cavalo, biotinilado. Esta incubação realizou-se à temperatura ambiente durante 2 h sob rotação suave. Seguiram-se lavagens idênticas às acima descritas e depois incubaram-se as culturas na presença de um complexo, pré-formado de peroxidase do

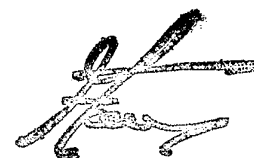
rábano, avidinbiotinilado (reagente ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA) preparado de acordo com o protocolo do fabricante. Após 30 min de incubação à temperatura ambiente sob rotação suave, lavaram-se as culturas como acima se descreveu. As culturas foram depois incubadas com 55 mM Tris-Cl, pH 7,3, contendo 0,5 mg/ml de diaminobenzidina e 0,01% peróxido de hidrogénio. Deixou-se o produto de reacção desenvolver durante 2-5 min, após o que se removeu a solução e se lavaram as culturas várias vezes em PBS arrefecido a gelo. Foi então determinado o número de células positivas/cm<sup>2</sup>.

O paraformaldeído e o glutaraldeído foram obtidos da Fluka Chemical. Os "kits" da Vectastain continham soro normal (usado como agente bloqueador), anti-imunoglobulina purificada por afinidade, biotinilada, avidina DH e HRP-H biotinilado foram adquiridos nos Vector Laboratories. A diaminobenzidina foi obtida de BRL (Gaithersberg, MD).

#### 12.1.3. MÉTODOS USADOS PARA MEDIR A TOMADA DE <sup>3</sup>H-DOPAMINA EM CULTURAS DE MESENCÉFALO VENTRAL

A tomada de <sup>3</sup>H-dopamina (<sup>3</sup>H-DA) foi realizada de acordo com Dal Toso et al. (1988, J. Neurosci. 8:733-745) com pequenas modificações. O tampão de tomada tinha a seguinte composição: NaCl, 136,8 mM, KCl, 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 8,0 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 mM, glucose, 5,0 mM, CaCl<sub>2</sub>, 1,0 mM, MgSO<sub>4</sub>, 1,0 mM, ácido ascórbico, 0,1 mM, pargilina, 0,1 mM, pH 7,4. Quando necessário juntava-se, ao tampão de tomada, 5,0 µM mesilato de benzotropina (BST).

As células foram lavadas uma vez com tampão de tomada pre-aquecida (37°C) e repostas em 0,4 ml tampão de tomada/2 cm<sup>2</sup> de poço. As culturas foram então pre-incubadas durante 5 min a 37°C. No fim desta pre-incubação juntou-se 0,1 ml <sup>3</sup>H-DA, em tampão de tomada (250 nM, 40 Ci/nMol), de modo tal que a concentração final de <sup>3</sup>H-DA no tampão era de 50 nM. As culturas foram incubadas a 37°C durante 15 min, seguindo-se quatro lavagens a 4°C, de 0,5 ml cada, com tampão de tomada. Também se realizaram duas lavagens adicionais com PBC arrefecido a gelo (10 mM NaPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl,



pH 7,6). Depois de se completar a última lavagem, juntaram-se às células 0,2 ml de NaOH, 0,5 N/2 cm<sup>2</sup> de poço, e deixou-se repousar à temperatura ambiente durante duas horas. Recolheu-se depois o extracto de NaOH e levou-se ao contador de cintilações (Packard, LS 500TD) com 10 ml de fluido de cintilação "ultimagold". A tomada específica foi definida como a tomada que era abolida na presença de 5 µM BZT. Normalmente, isto representada 70-90% da tomada total observada.

O <sup>3</sup>H-DA foi obtido de NEN (Boston, MA). Ascorbato, pargilina, BZT e glucose foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO). O fluido de cintilação "ultimagold" foi adquirido na Packard (Sterling, VA).

#### 12.1.4. MÉTODOS PARA PRODUZIR CULTURAS DE NEURÓNIOS COLINÉRGICOS DO PROSENCÉFALO BASAL

Produziram-se culturas primárias de células colinérgicas do prosencéfalo basal a partir de ratos no 17º dia embrionário. Especificamente, os neurónios colinérgicos usados neste estudo vieram do núcleo septal médio e do núcleo da banda diagonal de Broca. Esta população neuronal projecta-se principalmente no hipocampo. As culturas misturadas dissociadas (neurónios e glia) foram produzidas pelo processo seguinte. A região septal foi separada, por dissecação, do tecido circundante e retirada do cérebro do feto. Os bocados de tecido foram então misturados, cortados com tesoura e tratados durante 20 min a 37°C com 12,5% tripsina. A tripsina foi inactivada por diluição no meio de cultura da placa (meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 1% penicilina e estreptomicina, 5% soro de cavalo e 1% N3, um suplemento hormonal). Obteve-se uma suspensão de células isoladas por trituração dos fragmentos digeridos de tecido com uma pipeta de pasteur aperfeiçoada ao fogo. As células dissociadas foram contadas num hemocitómetro e colocadas em placa, a uma densidade apropriada, no meio de cultura da placa. Juntaram-se às culturas os ligandos do ensaio, 5 a 6 horas depois da colocação em placa, e as células desenvolveram-se in vitro durante 10 dias, com mudanças de meio em cada três dias.



#### 12.1.5. AVALIAÇÃO COM ACETILCOLINA-TRANSFERASE

Depois do período de tratamento as células foram usadas em ensaios do enzima acetilcolina-transferase (CAT) ou processados por coloração imuno-histoquímica pela CAT, utilizando o seguinte protocolo. O anticorpo monoclonal contra a CAT foi adquirido na Boehringer Mannheim Biochemical Co. e caracterizado algures. No fim do período experimental as células foram lavadas duas vezes com DMEM. Fixaram-se as culturas por um processo em duas etapas; juntaram-se 50 µl de 4% paraformaldeído a 50 µl de DMEM durante um período de incubação de 10 min. Esta solução foi removida e substituída por 100 µl de 4% paraformaldeído e a incubação continuou por 30 min à temperatura ambiente. Depois da fixação, lavaram-se as células por 3 vezes com soro salino tamponado com fosfato (PBS) e permeabilizaram-se por uma incubação de 30 min com saponina (0,5 mg/ml). Removeu-se o detergente com 3 lavagens de PBS e juntou-se durante 30 min uma solução bloqueadora de soro normal, a 5%, de coelho. Juntou-se o anticorpo primário a uma diluição de 1:3 em 1% soro normal de coelho após remoção da solução bloqueadora, e incubaram-se as culturas durante a noite a 4°C. Com uma lavagem de PBS removeu-se a solução que continha o anticorpo primário. A imunoglobulina ligada foi detectada pelo método "ABC" da Vectastain. Usou-se tetracloridrato de diaminobenzideno (DAB) como substrato da reacção da peroxidase que usualmente demora a realizar-se de 1 a 5 minutos. Parou-se a reacção por lavagem das culturas por 2 vezes com 0,1 M tris-HCl pH 7,2. Guardaram-se as culturas em 50 mM tris, pH 7,6, contendo 0,15 M NaCl, 42% glicerol e 0,15% Zephiran (Pierce Chemical Co., Rockville, IL) a 4°C.

#### 12.1.6. MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE CULTURAS DE CÉLULAS

##### ASTROGLIAIS PURIFICADAS

Prepararam-se culturas gliais purificadas pelo método de McCarthy and DeVellis (McCarthy, K. D., e DeVellis, J., 1980, J. Cell Biol. 85:890-902) do hipocampo do rato post-natal com 1-2 dias. Os hipocampus foram removidos de 5 recém-nascidos e cortados com tesoura. As peças de tecido foram então digeridas em 2 ml de 0,125% tripsina, durante 20 min, a 37°C. A protease foi

inactivada por diluição com meio de placa (10% de soro bovino fetal da Gibco, DMEM, 0,5% penicilina (5000 mcg/ml) e 0,5% glutamina). Obteve-se uma suspensão de células isoladas fazendo passar os fragmentos de tecido digeridos, por uma pipeta de pasteur afilada. As células foram peletizadas por centrifugação a 900 rpm durante 5 min, ressuspensas no meio de placa e depois contadas num hemocitômetro. A suspensão de células isoladas foi dividida em três balões de 75 cm<sup>2</sup> de área, para cultura de tecidos e deixaram-se as células desenvolverem-se até cerca de 80% de confluência. As células foram então sub-cultivadas por um protocolo de tripsinização semelhante ao acima descrito. As células gliais foram contadas e postas em placa a uma densidade de 10 000 células/0,9 cm<sup>2</sup>.

## 12.2. RESULTADOS

### 12.2.1. EFEITO DO BDNF SOBRE A TIROSINA-HIDROXILASE PRESENTE EM CULTURAS DE MESENCÉFALO VENTRAL

A coloração imunocitoquímica descrita na secção 12.1.2, supra, foi usada para medir o efeito do BDNF sobre o número de células positivas à tirosina-hidroxilase (TH) (Fig. 8). No 8º dia observou-se um aumento máximo de mais de 200% do valor do controlo, em células de mesencéfalo ventral de culturas estimuladas pelo BDNF. Observou-se um ligeiro aumento bem cedo, no 3º dia de cultura, nas culturas estimuladas pelo BDNF.

### 12.2.2. EFEITO DO BDNF NA TOMADA DE DOPAMINA POR CULTURAS DE MESENCÉFALO VENTRAL

A tomada de <sup>3</sup>H-dopamina (<sup>3</sup>H-DA) foi medida de acordo com o método de Dal Taso et al. (1988, J. Neurosci. 8:733-745) com pequenas modificações, como se descreve na secção 12.1.3., supra. Observou-se um ligeiro aumento de tomada de dopamina, no 8º dia de cultura, em culturas de mesencéfalo ventral estimuladas pelo BDNF (Fig. 9).

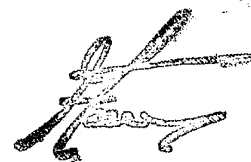
### 12.2.3. EFEITO DO BDNF SOBRE A EXPRESSÃO DA ACETILCOLINA-TRANSFERASE POR NEURÓNIOS COLINÉRGICOS DO PROSENCÉFALO

A Figura 10 (a) mostra o efeito do BDNF sobre o número de células positivas ao CAT após um período de crescimento de 12

dias in vitro. Observou-se um aumento de 5,9X no número de células CAT, com a adição de 100 ng/ml de BDNF, sendo a EC50 calculada em 10 ng/ml. Como controlo positivo trataram-se culturas, a 260 000 (barras a negro) ou 150 000 (barra a tracejado) células por poço, por processo idêntico ao do NGF (Figura 10 (b)). A densidade de 260 000 células por poço corresponde à usada no estudo do BDNF. Este aumento de número de células imunopositivas ao CAT é semelhante ao anteriormente relatado. O potencial do BDNF para agir sobre neurónios colinérgicos foi também examinado, medindo a actividade do enzima CAT (F. Fonnum; J. Neurochemistry, 1975, 24:407-409). A Figura 11 mostra as variações do CAT produzidas pelo tratamento com o BDNF. Neste caso, alcançou-se um aumento de 1,8X com 100 ng/ml de BDNF e a EC50 foi calculada em 61 ng/ml.

#### 12.2.4. EFEITO DO BDNF OU DO EGF SOBRE CULTURAS DE CÉLULAS ASTROGLIAIS

Os astrócitos do Tipo II demonstraram possuir receptores de elevada afinidade para diversos neurotransmissores e neuropéptidos. Assim, os astrócitos são capazes de responder a sinais de origem neuronal. Por esta razão e porque os astrócitos do tipo II representam um componente celular nas culturas primárias, investigou-se um possível efeito directo do BDNF sobre células gliais. Mantiveram-se as células in vitro durante 4 dias antes da adição de factores de crescimento para permitir que alcançassem cerca de 60% de confluência e foram depois tratadas durante 42 h com EGF ou BDNF. Durante as últimas 18 h de incubação esteve presente no meio [<sup>3</sup>H]metilimidina. O efeito do EGF está indicado na Figura 12 (a). Como anteriormente se referiu, verificou-se que o EGF era mitogénico para os astrócitos. A resposta máxima foi observada com 10 ng/ml de EGF que produziu um aumento de 5,2X na incorporação de [<sup>3</sup>H]metilimidina. A Figura 12 (b) mostra o efeito do BDNF sobre a incorporação de [<sup>3</sup>H]metilimidina. A resposta do BDNF parece ser bifásica: doses muito baixas (0,1 ng/ml) produziram um ligeiro aumento de incorporação de timidina, enquanto que doses superiores a 1 ng/ml de BDNF inibiram a incorporação de [<sup>2</sup>H]metilimidina. O BDNF numa dosagem de 5 ng/ml



produziu uma inibição de 24%, o que sugere um decréscimo na taxa de proliferação das células gliais durante o período de tratamento.

### 12.3. DISCUSSÃO

Estas experiências in vitro mostram claramente que o BDNF mantém a sobrevivência ou induz o estado completamente diferenciado, nos neurónios dopaminérgicos, do desenvolvimento da substância negra do rato, como se mostrou pela coloração da tirosina-hidroxilase e tomada de dopamina em culturas destes neurónios vindos do mesencéfalo embrionário do rato. Como estes são os neurónios que provocam a doença de Parkinson, é altamente provável que o BDNF tenha um potencial terapêutico sobre a doença de Parkinson, quer reduzindo a perda de neurónios quer aumentando os níveis de tirosina-hidroxilase (enzima limitador na síntese de dopamina) ou possivelmente ambos.

Além disso, tal como o factor de crescimento do nervo (NGF), o BDNF parece ter efeito sobre a sobrevivência de neurónios colinérgicos do prosencéfalo basal do rato, como se mostrou pelo aumento da coloração da acetilcolina-transferase (CAT), pelo aumento da actividade do CAT e aumento da coloração da acetilcolina-transferase em culturas do núcleo septal médio do embrião do rato e núcleo da banda diagonal de Broca. Assim, o BDNF, sózinho ou conjuntamente com o NGF, pode ser útil no tratamento de doenças ou de distúrbios que afectem os neurónios colinérgicos do prosencéfalo basal, incluindo, por exemplo, a doença de Alzheimer.

### 13. EXEMPLO: IDENTIFICAÇÃO DE UM NOVO GENE DA FAMÍLIA DE GENES BDNF/NGF

A primeira tentativa de identificação de novos membros da família de genes NGF/BDNF utilizando a PCR com oligonucleótidos degradados, baseada na conservação de segmentos de sequências de aminoácidos entre NGF e BDNF (Caixas 1-4, ver secção 5.8), foi realizada determinando se os pares destes iniciadores poderiam ser utilizados para amplificar tanto as sequências de genes do NGF como do BDNF, a partir do ADN genómico de várias espécies.



Este método foi depois usado para identificar um novo gene que partilhasse homologias com o NGF e BDNF em todas as 4 caixas da homologia referida.

### 13.1. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 13.1.1. REACÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE

A PCR foi essencialmente realizada como se descreveu na Secção 6, supra.

### 13.2. RESULTADOS

#### 13.2.1. AMPLIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS TANTO DO NGF COMO DO BDNF A PARTIR DE ADN GENÓMICO

Foram sintetizados iniciadores de oligonucleótidos sintéticos degradados correspondentes às porções de conservação das sequências de aminoácidos da Caixa 1 e Caixa 2, entre o NGF e o BDNF (ver Secção 5.8., acima), e utilizados numa reacção de PCR com ADN genómico do rato, como padrão. As sequências exactas dos iniciadores foram as seguintes (posições de degradação, com mistura de duas ou mais bases incluídas na etapa de síntese dos oligonucleótidos, mostradas entre parêntesis; a *itálico* sublinhado indicam-se as caudas com múltiplos locais de cisão pela endonuclease de restrição para facilitar a ligação ao vector na fase de clonação seguinte; A = adenina, G = guanina, C = citosina, T = timina, N = mistura de A, G, C, T):

Caixa 1 (sentido), iniciador 1B:

5'-GACTCGAGTCGACTCGGTGTG(C,T)GACAG(C,T)(A,G)T(C,T,A)AG-3'

Caixa 2 (anti-sentido), iniciador 2C:

5'-CCAAGCTTCTAGAATTCCA(C,T)TT(N)GT(C,T)TC(A,G)(A,T)A(A,G)AA(A,G),TA-(C,T)TG-3'

Juntaram-se 300 ng de cada mistura de iniciadores degradados, a 500 ng de ADN genómico do rato em 100 µl da mistura clássica de reacção da PCR. Realizaram-se 35 ciclos, consistindo, cada um, numa incubação de 1 min a 94°C, de 2 min a 43°C e de 2 min a 72°C. O tamanho previsto do produto de amplificação, por PCR, quer do gene do BDNF quer do gene do NGF, usando estes iniciadores, seria de 175 pares de base, incluindo as 2 caudas



17-meras (a sublinhado) incluídas por conveniência nas etapas de clonagem subsequentes. A electroforese da mistura de reacção sobre um gel de 8% poliacrilamida/5% glicerol deu um banda principal de ADN amplificado do tamanho previsto, 175 pb.

13.2.2. DETECÇÃO DE SEQUÊNCIAS COMPLEMENTARES DAS  
SONDAS DE BDNF/NGF EM ADNs GENÓMICOS DE VÁRIAS ESPÉCIES

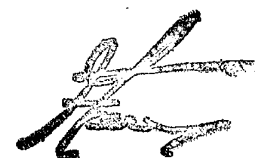
A banda de 175 pb foi removida do gel de acrilamida por electroeluição e amplificada a seguir numa segunda reacção PCR de 7 ciclos, em condições de reacção idênticas à primeira excepto nas concentrações de dGTP, dATP e TTP que baixaram até 50  $\mu$ M cada e no marcador  $^{32}$ alfa-P = dCTP utilizado em vez da dCTP não marcada. O produto de ADN radiomarcado foi separado dos componentes da reacção por cromatografia numa coluna de calibração. Esta sonda, designada por "R1B/2C" (para o ADN do rato, amplificado a partir dos iniciadores 1B e 2C), foi então utilizada para detectar sequências complementares em ADNs genómicos de várias espécies de vertebrados (os resultados com ratos, ratinhos e frangos estão indicados na Figura 13), após digestão com endonuclease de restrição EcoRI e mancha na nitrocelulose pelo método de hibridação Southern sobre ADNs genómicos digeridos pela EcoRI, como se indica na Figura 13.

O tamanho dos fragmentos, obtidos pela EcoRI, do ADN genómico contendo sequências de NGF e BDNF, foi determinado em controlos em paralelo de manchas, usando sondas de NGF e BDNF humanos, radiomarcadas, preparadas por PCR a partir de genes clonados. As posições dos fragmentos genómicos, pela EcoRI do NGF e BDNF estão indicadas na Figura 13, em N e B, respectivamente. Na Figura 3 estão apresentados resultados de uma análise semelhante; na Figura 3 mostram-se resultados equivalentes usando a sonda de BDNF humano e a sonda de BDNF porcino. Como se disse acima, cada uma das sondas de NGF e BDNF hibridaram com fragmentos isolados de EcoRI em diversos ADNs genómicos de vertebrados. Por exemplo, no ADN do rato a sonda de BDNF detectou uma banda de aproximadamente 8,8 kb, enquanto que a sonda de NGF detectou uma banda de aproximadamente 10,4 kb.

Como se pode ver na Figura 13, em cada espécie testada (resultados indicados para o frango, ratinho e rato) a sonda R1B/2C hibridou com uma banda de ADN indistinguível da identificada pela sonda de NGF bem como uma banda indistinguível da identificada pela sonda de BDNF (no ratinho, os fragmentos EcoRI genómicos do NGF e BDNF têm a mesma mobilidade electroforética, correspondente a aproximadamente 11,5-12,0 kb). Isto demonstra que os oligonucleótidos iniciadores degradados 1B e 2C podem ser utilizados para amplificar sequências tanto dos genes do BDNF como do NGF. Vale a pena notar que nalguns casos se observaram bandas adicionais na mancha genómica Southern hibridada com a sonda R1B/2C. Por exemplo, no ADN genómico do ratinho, digerido por EcoRI, observaram-se pelo menos duas bandas adicionais (marcadas X1 e X2, de aproximadamente 19,0 kb e 1,5 kb, respectivamente) que não correspondiam nem ao NGF nem ao BDNF. Analogamente, observaram-se pelo menos duas bandas adicionais na hibridação do BDNF do rato (X1, X2, de aproximadamente 7,3 e 1,2 kb, respectivamente) e pelo menos uma no ADN do frango (X, aproximadamente 2,6 kb). Nalguns casos também se observaram bandas adicionais que não estão explicitamente marcadas nesta figura. A presença de bandas não atribuíveis ao NGF ou ao BDNF sugere a possível existência de membros adicionais da família de genes. De modo análogo foram encontradas bandas claramente distintas daquelas que se sabe conterem sequências dos genes de BDNF e NGF, utilizando outros conjuntos de pares de iniciadores e de moldes de ADN genómico (resultados não indicados).

### 13.2.3. IDENTIFICAÇÃO DE UM NOVO GENE LIGADO AO BDNF E NGF

Uma verificação específica da hipótese de que novos genes relacionados com o NGF e BDNF poderiam ser identificados por PCR usando oligonucleótidos degradados iniciadores foi realizada usando iniciadores da Caixa 3 e Caixa 4 (ver Secção 5,8., acima) e ADN genómico do ratinho, como molde. Os iniciadores degradados foram sintetizados a partir das sequências:



Caixa 3 (sentido):

5'-GGGGATCCGCGGTTG(T,C)(C,A)GIGGIAT(T,C,A,)GA-3'

Caixa 4 (anti-sentido):

5'-TCGAATTCTAGATTC(T,G)IAT(AG)AAIC(T,G)LCCA-3'

(G=guanina, A=adenina, C=citosina, T=timidina, I=inosina; misturas de mais de uma base numa só posição no oligonucleótido estão indicadas entre parêntesis). Note-se que a inosina foi utilizada nalgumas posições correspondentes à terceira base ("wobble"=de oscilação) de um códon, para permitir a degradação do código genético. É também possível utilizar uma mistura das 4 bases convencionais do ADN em vez da inosina e os resultados obtidos têm sido essencialmente idênticos aos obtidos com estes iniciadores.

Com o par de iniciadores degradados Caixa 3/Caixa 4, seria de esperar que a PCR, a partir de sequências genómicas de NGF e BDNF no ADN do ratinho, amplificasse um segmento de aproximadamente 90 pb. Utilizando os iniciadores acima indicados, realizou-se a PCR durante 4 ciclos com uma temperatura de têmpera de 45°C, seguidos de 31 ciclos com uma temperatura de têmpera de 49°C. Os produtos foram analisados por electroforese em gel e observou-se uma banda principal com o tamanho esperado. No ratinho, o gene do NGF contém um local de cisão de endonuclease de restrição HindII na região entre a Caixa 3 e a Caixa 4, enquanto que o gene do BDNF contém um local de cisão para a enzima Apal nesta região. Portanto, seria de esperar que a digestão do produto da amplificação por PCR com HindII e Apal eliminasse as sequências de NGF e BDNF da banda do produto principal. Contudo, quando o produto da PCR foi aparentemente completamente digerido com estas duas enzimas de restrição, verificou-se que persistia no ADN amplificado uma banda resistente à digestão. Isto sugere que, além dos genes do NGF e BDNF, pelo menos um novo gene foi amplificado.

#### 13.2.4. CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO MEMBRO DA FAMÍLIA DE GENES BDNF/NGF

O produto da PCR, resistente à digestão, foi eluído num gel e utilizado como molde em reacções PCR assimétricas, onde um



qualquer dos iniciadores degradados originais estava presente num excesso 100 x molar em relação ao outro iniciador. Esta amplificação assimétrica permitiu a preparação de moldes de ADN de uma só espira, adequados ao sequenciamento pelo método de terminação da cadeia. A análise sequencial do novo gene (aqui designado por "M3/4" mas também referido como Neurotrofina-3) continuou ainda por amplificação por PCR das sequências entre exactamente o iniciador localizado entre as Caixas 3 e 4, e a sequência poli-A do extremo 3' do transcrito do gene, usando a estratégia da "amplificação rápida dos extremos do ADNc" (RACE) descrita por M. A. Frohman, M. K. Dush, e G. R. Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8998-9002 (1988). Os resultados do sequenciamento do ADN revelaram que tinha sido amplificado um novo gene que compreendia uma estrutura de leitura aberta capaz de codificar um polipéptido distinto tanto do NGF como do BDNF, mas com uma sequência de aminoácidos muito relacionada com ambos (Figura 14).

Obteve-se uma evidência preliminar de que este novo gene codificava um factor neurotrófico, pela determinação do seu padrão de expressão nos tecidos do rato por hibridação da mancha Northern. Esta análise indicou que o novo gene se expressa muito mais fortemente nos tecidos do cérebro do que em qualquer outro tecido examinado.

### 13.3. DISCUSSÃO

Como se mostra acima (Figura 13), a sonda de ADN obtida por amplificação por PCR usando iniciadores das Caixas 1 e 2 com ADN genómico do rato, como molde (R1B/2C) hibridou com novas bandas além das que já se sabe conterem sequências de genes do NGF e BDNF em ADN digerido pela EcoRI de todas as espécies testadas. Foi conduzida uma análise semelhante usando uma sonda marcada radioactivamente para o novo gene amplificado usando iniciadores de Caixas 3 e 4 sobre o ADN genómico do ratinho (M3/4). Em cada caso a sonda M3/4 hibridou uma única banda principal de ADN genómico digerido pela EcoRI, que era distinta das bandas que se sabia conterem sequências do BDNF e NGF. Deve notar-se que os fragmentos EcoRI do ADN genómico do ratinho, rato e frango,

observados pela hibridação com a sonda M3/4, são em todos os casos coincidentes com uma das novas bandas obtidas por hibridação com a sonda R1B/2C. São eles o fragmento EcoRI de 19,0 kb no ADN do ratinho (X1 na Figura 14), o fragmento de 7,3 kb no ADN do rato (X1 na Figura 14) e a banda de 2,6 kb no ADN do frango (X na figura 14). Isto sugere que porções do mesmo gene foram amplificadas a partir do ADN do rato usando o par iniciador 1B/2C e do ADN do ratinho usando o par iniciador 3/4. Assim, pelo menos um novo gene aparentemente partilha homologia com os genes do NGF e BDNF em todas as 4 caixas de homologia acima referidas.

O conceito de caixas de homologia entre NGF e BDNF e outros membros da família de genes (p. ex. "M3/4" também conhecido como NT-3) tem sido aqui expresso principalmente em termos de sequência principal de aminoácidos e de métodos para identificar novos genes da família. É contudo importante notar que há provavelmente implicações adicionais para a estrutura secundária e terciária destes factores neurotróficos, para as suas interações com receptores específicos e planeamento racional de novas moléculas com valor terapêutico potencial.

Por exemplo, há 6 resíduos Cys no NGF e verificou-se que todos eles estão envolvidos em ligações dissulfureto. Numerando-os desde o N "mais terminal" ao C "mais terminal", como Cys 1-Cys 6 é sabido que as pontes dissulfureto envolvem Cys 1-Cys 4, Cys 2-Cys 5, Cys 3-Cys 6. As posições de todos os 6 resíduos Cys estão conservadas entre NGF e BDNF, e as posições de 3 resíduos Cys na porção do "M3/4" até agora sequenciada alinham exactamente com Cys 4, Cys 5, Cys 6 do NGF e BDNF. Isto sugere que a estrutura secundária de todos os membros da família de genes pode estar estreitamente relacionada e grandemente determinada pelos resíduos Cys conservados. Deve notar-se que as caixas de homologia indicadas para o BDNF e NGF cobrem 5 dos 6 resíduos Cys (Cys 1 na Caixa 1, Cys 2 na Caixa 2, Cys 3 na Caixa 3, Cys 5 e Cys 6 na Caixa 4). Isto apoia a ideia de que estes resíduos Cys e os seus vizinhos imediatos desempenham um papel importante na determinação da estrutura geral destes factores neurotróficos. Os determinantes estruturais da interacção específica com receptores



de elevada afinidade de cada um dos factores neurotróficos residem presumivelmente em porções únicas de cada molécula.

Assim, os novos genes quiméricos podem ser produzidos por recombinação entre membros da família (p. ex., por recombinação in vitro ou por síntese directa dos genes) em qualquer das 4 caixas de homologia já descritas ou algures na molécula. Estas proteínas quiméricas têm provavelmente uma estrutura secundária semelhante, devido à conservação dos resíduos Cys, e outros resíduos de aminoácidos, mas podem ter novas propriedades biológicas. Por exemplo, uma proteína quimérica de BDNF/NGF pode ser bifuncional em termos de interacção com os receptores tanto do BDNF como do NGF. As proteínas quiméricas podem também diferir das moléculas aparentadas em termos de dimerização e de outras propriedades físico-químicas. As proteínas quiméricas podem também ser capazes de funcionar como antagonistas de qualquer das moléculas aparentadas.

Os fragmentos activos de BDNF/NGF podem ser usados para preparar outros membros da família com base no conhecimento das regiões "nucleares" críticas para o apropriado envolvimento, e também na informação referente às regiões que sejam necessárias para a interacção de tipo específico com os receptores.

A comparação de novos membros da família (p. ex., "M3/4") com membros da família já conhecidos pode ser utilizada para revelar novas caixas de homologia que possam ajudar a orientar a pesquisa de outros membros da família de genes BDNF/NGF. Por exemplo, a comparação de "M3/4" com o BDNF revela algumas caixas de homologia úteis. Uma de particular interesse envolve o quarto resíduo Cys conservado, o único que não está nas Caixas 1-4 anteriormente referidas. Há realmente um segmento de identidade bastante longo ou de substituição de aminoácidos conservados partilhados pelo BDNF e "M3/4" que inclui este resíduo Cys, nomeadamente: His-Trp-Asn-Ser-Gln-Cys-(Arg ou Lys)-Thr(Thr ou Ser)-Gln-(Ser ou Thr)-Tyr-Val-Arg-Ala-Leu-Thr. Dentro desta região poderiam escolher-se pelo menos duas caixas de homologia para a síntese de oligonucleótidos iniciadores, degradados, úteis (p.

ex. His-Trp-Asn-Ser-Gln-Cys necessita apenas uma degradação de 96X para um iniciador 18-mero ou uma degradação de 48X para um 17-mero; Tyr-Val-Arg-Ala-Leu-Thr também seria uma caixa útil).

#### 14- EXEMPLO: AUMENTO DE EXPRESSÃO DO BDNF EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMAS

##### 14.1. MATERIAIS E MÉTODOS

##### 14.1.1. LINHAS DE CÉLULAS

CHP100, CHP126, CHP134, CHP234, LAN1, LAN5, NB9, SY5Y, Y79, F01, BU2, H01, HL60 e COL320 são linhas de células mantidas no laboratório do Dr. Fred Alt que fornecem ARN para a mancha Northern usada na Figura 15. Todas as linhas de células eram linhas de células de tumores humanos. CHP100 é uma linha de células de neuroepitelioma; CHP126, CHP134, CHP234, LAN1, LAN5, NB9, e SY5Y são linhas de células de neuroblastoma; Y79 é uma linha de células de retinoblastoma; F01, BU2, H01 são linhas de células de melanoma, HL60 é uma linha de células de leucemia promielocítica, COL320 é uma linha de células de carcinoma neuroendócrino do cólon.

##### 14.1.2. PREPARAÇÃO DO ARN

Preparou-se ARN e manchas Northern foram executadas essencialmente como está descrito na Seção 8.1.1., supra, usando uma sonda de todo o comprimento de ADN humano. Foram postos 10 µg de ARN total em cada faixa de gel usado para produzir a mancha Northern da Figura 15, com exceção do ARN em LAN1 que tinha menor carga e do SY5Y onde se usou 1 µg de poli(A)<sup>+</sup> de ARN.

##### 14.2. RESULTADOS

A Figura 15 mostra os resultados da análise da mancha Northern da sonda de BDNF hibridada com um painel de amostras de ARN obtidas de diversas linhas de células humanas. Detectou-se abundante ARN hibridado com a sonda de BDNF nas linhas de células CHP234 e LAN5, e menores quantidades nas CHP126 e CHP134. Todas as linhas positivas vieram de tumores neuroblastoma humanos.

15. EXEMPLO: A REGULAÇÃO DEPENDENTE DA ACTIVIDADE DE  
ARNms DO BDNF E NGF NO HIPOCAMPO DO RATO É MEDIADA  
POR RECEPTORES DE GLUTAMATO NÃO-NMDA

15.1. MATERIAIS E MÉTODOS

15.1.1. TRATAMENTO DE RATOS COM ÁCIDO CAÍNICO

Os ratos receberam usualmente diazepam (Valium) 90 min depois da injeção intraperitoneal de ácido caínico a 12 mg/kg para suprimir actividade intensa devido à captura. Como se indica na Fig. 19, o Valium dado após o ácido caínico não interferiu com os novos aumentos dos níveis de ARNm do BDNF e NGF. Os ratos que não receberam Valium mostraram aumentos semelhantes dos níveis de ARNm do BDNF e NGF no hipocampo, 3 horas após o ácido caínico, comparados com os animais que receberam ácido caínico seguido de Valium.

15.1.2. PREPARAÇÃO DE CULTURAS DO HIPOCAMPO

Os hipocampus foram preparados a partir de embriões de ratos E17 (dias de idade), dissecados e incubados durante 20 min a 37°C em soro salino tamponado com fosfato (PBS) sem iões de cálcio ou de magnésio mas contendo 10 mM glucose, 1 mg/ml albumina, 6 µg/ml DNase e 1 mg/ml papaína. Depois de lavar com a solução sem papaína, as células do hipocampo foram cuidadosamente dissociadas por uma pipeta de pasteur aperfeiçoada ao fogo. As células foram recolhidas por centrifugação a baixa velocidade, ressuspensas em DMEM suplementado com 10% de soro de feto de vitela e colocadas em placas plásticas de cultura (0,5 x 10<sup>6</sup> células por 35 mm) previamente revestidas com poli-DL-ornitina (0,5 mg/ml) e laminina (5 µg/ml). 3 h depois da colocação em placa, mudou-se o meio para um isento de soro, que continha os suplementos descritos por Brewer e Cotman (Brain Res. 497:65, 1989), mas sem glutamato. Os neurónios permaneceram viáveis até três semanas de cultura e foram usualmente usados nas experiências do 7º dia após colocação em placa.

15.1.3. AMPLIFICAÇÃO DO ARN

O ARN total celular foi extraído segundo Chomcynski and Sacci (Anal. Biochem., 1987, 162:156-159), a partir de 0,5 x 10<sup>6</sup> células após a adição de um padrão de recuperação de ARNc de um

NGF (encurtado) (30 fg). O ARNm e o ARNc do NGF foram coamplificados numa reacção em cadeia de polimerase/transcrição inversa (PCR/RT) juntas num tubo contendo 1/5 do ARN extraído, tampão 1xRT/PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/ml gelatina, 0,1% Triton X-100), 0,25 mM dNTP, 0,1 µM de cada iniciador 5' e 3', 5U RNasin (Promega), 3,2 U AMV-transcriptase inversa (Life Science) e 2 U Taq Polimerase (Geno-fit) num volume total de 25 µl. A mistura foi coberta com óleo mineral, incubada a 41°C durante 30 min, aquecida a 92°C durante 60 segundos, com ténpera de iniciador a 55°C durante 60 s e extensão de iniciador a 72°C durante 60 s. Os produtos da amplificação (203 pb de ARNm de NGF a 153 pb do padrão de recuperação) foram separados sobre 3% NuSieve/gel de Agarose 3:1 (FMC Bioproducts), manchados com alcali em membrana Hybond N plus (Amersham) e hibridados segundo (Heumann, R. and Thoenen, H., 1986, J. Biol. Chem. 261:9246; Lindhold et al., 1988, J. Biol. Chem. 263:16348). Para quantificação absoluta, foram coamplificados, em reacções paralelas, quantidades conhecidas de ARNm de NGF transcritas in vitro e o padrão de recuperação. Um método semelhante foi recentemente descrito por Wang et al. (PNAS 86:9717-9721, 1989).

#### 15.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O BDNF e o NGF são membros de uma família de genes com cerca de 50% de aminoácidos idênticos (Leibrock et al., 1989, Nature 341:149). As moléculas revelam domínios estritamente conservados. Estão contidos nestes domínios os 6 resíduos de cisteína muito provavelmente implicados na estabilização da estrutura tridimensional destas moléculas, necessária para a sua actividade biológica. Há também, contudo, domínios variáveis no BDNF e NGF que determinam a sua diferente especificidade neuronal (Lindsay et al., 1985, Dev. Biol. 112:319; Johnson et al., 1986, J. Neurosci. 6:3031; Hofer, M. and Barde, Y. 1988, Nature 331:261; Rodriguez-Tebar et al., 1989, Dev. Biol. 136:296). Além disso a diferença entre estas duas moléculas neurotróficas é também indicada pelos seus locais de síntese. O NGF está expresso tanto na periferia (Korsching, S. and Thoenen, H., 1983, Proc. Natl.



Acad. Sci. U.S.A. 80:3513; Ebendal et al., 1983, Exp. Cell Res. 148:311; Heumann et al., 1984, EMBO J. 3:3183; Dhelton, D.L. e Reichardt, L.F., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:7951) como no sistema nervoso central (SNC) (Korsching et al., 1985, EMBO J. 4:1389; Shelton, D.L. e Reichardt, L.F., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:2714; Whittemore et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:817; Large et al., 1986, Science 234:352). A densidade de inervação dos neurónios que respondem ao NGF reflecte os níveis de NGF nos tecidos-alvo correspondentes (Korsching, S. and Thoenen, H., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:3513; Ebendal et al., 1983, Exp. Cell Res, 148:311; Heumann et al., 1984, EMBO J. 3:3183; Dhelton, D.L. e Reichardt, L.F., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:7951; Korsching et al., 1985, EMBO J. 4:1389; Shelton, D.L. and Reichardt, L.F., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:2714; Whittemore et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:817; Large et al., 1986, Science 234:352). Em contraste com o NGF, o BDNF está predominantemente expresso no SNC, nos neurónios, e os níveis de ARNm do BDNF são consideravelmente mais elevados do que os de ARNm do NGF, p. ex., cerca de 50x no hipocampo. No sistema nervoso periférico, o NGF é sintetizado por vários tipos de células não neuronais (Bandtlow et al., 1987, EMBO J. 6:891), enquanto que no cérebro está principalmente localizado nos neurónios, como foi demonstrado pela hibridação *in-situ* (Rennert, P.D. and Heirich, G., 1986, Biochem. Biophys. Res. Commun. 138:813; Ayer-LeLievre et al., 1988, Science 240:1339; Whittemore et al., 1988, J. Neurosci. Res. 20:403). Contudo, tem-se também observado que os astrócitos de cultura, tipo 1, produzem quantidades substanciais de NGF (Lindsay, R.M., 1979, Nature 282:80; Furukawa et al., 1987, Biochem. Biophys. Res. Commun. 142:395). A contribuição relativa dos neurónios e astrócitos para o NGF sintetizado no cérebro não é ainda conhecida.

Em vista da expressão predominante dos ARNms, tanto do BDNF como do NGF, nos neurónios do sistema nervoso central, fomos investigar se os níveis destes dois ARNms são influenciados pela actividade neuronal e, se assim for, quais os transmissores que



poderiam estar envolvidos na regulação. Numa primeira série de experiências, preparámos culturas neuronais do hipocampo embrionário (E17) do rato. Como se mostrou na Figura 16a, a despolarização dos neurónios do hipocampo com muito potássio (50 mM) provoca um aumento do ARNm do BDNF. Obtêm-se níveis máximos entre 3 e 6 h após o aumento da concentração do potássio. O aumento do ARNm do BDNF, mediado pelo potássio, podia ser inibido pela omissão de iões de cálcio no meio e era também reduzido pela inibição do influxo de cálcio pela nifedipina, bloqueadora do canal de cálcio (Fig. 16b).

Como as culturas do hipocampo usadas eram constituídas por uma população mista de neurónios que mostram diferentes padrões de expressão do transmissor e do receptor, estudámos o efeito de vários agonistas dos receptores fisiológicos e sintéticos, sobre a expressão do ARNm do BDNF e NGF. Os resultados apresentados no Quadro VI mostram que de todas as substâncias ensaiadas, o ácido cainico, um agonista do receptor de glutamato (Monaghan et al., 1989, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29:365), produzia, de longe, o maior aumento do ARNm do BDNF nos neurónios do hipocampo. Em contraste, outras moléculas como o carbacol (um agonista do receptor muscarínico) e, em menor extensão, a histamina e a bradiquinina, elevam ligeira mas significativamente o ARNm do BDNF (Quadro VI). Devido aos níveis do ARNm do NGF nos neurónios do hipocampo serem muito baixos, estabelecemos um método de reacção, quantitativo, em cadeia de polimerase (PCR) adequado para a determinação das variações do ARNm do NGF. Usando este método observámos que, tal como no ARNm do BDNF, os níveis do ARNm do NGF eram também aumentados pelo potássio e pelo ácido cainico nos neurónios do hipocampo (Figura 17).

Como se mostra na Figura 18, o aumento máximo do ARNm do BDNF nos neurónios do hipocampo foi obtido com cerca de 25  $\mu$ M ácido cainico. Um novo aumento da concentração do ácido cainico resultava num decréscimo dos níveis do ARNm do BDNF, o que, muito provavelmente, reflecte efeitos tóxicos das elevadas concentrações de ácido cainico sobre os neurónios do hipocampo (Figura 18). A neurotoxicidade mediada pelo receptor de glutamato

já foi relatada (Choi et al., 1987, J. Neurosci. 7:357; Rothman, S.M. e Olney, J.W., 1987, Trends Neurosci. 10:299; Choi, D.W., 1988, Neuron 1:623) para vários neurónios centrais após aplicação de análogos dos glutamatos de aminoácidos excitadores. Contudo as concentrações de ácido cainico necessárias para melhorar a expressão do ARNm do BDNF e NGF nos neurónios do hipocampo podem claramente ser separadas das concentrações que resultam em neurotoxicidade.

Para investigar, em maior detalhe, o efeito do ácido cainico fomos verificar se o aumento em ARNm do BDNF poderia ser bloqueado por qualquer dos antagonistas conhecidos do receptor de glutamato (Monaghan et al., 1989, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29:365). O ácido quinurénico, um antagonista do receptor de glutamato de espectro largo, bem como o CNQX, um inibidor competitivo dos receptores não-NMDA (Monaghan et al., 1989, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29:365), bloquearam completamente o aumento em ARNm do BDNF, mediado pelo ácido cainico, nos neurónios do hipocampo (Quadro VII). Por outro lado, o MK801, que bloqueia especificamente os receptores de NMDA foi ineficaz no bloqueamento do aumento de ARNm do BDNF nestes neurónios. Além disso, o próprio NMDA não alterou os níveis de ARNm do BDNF (Quadro VI). Isto mostra que o ácido cainico actua directamente através dos seus receptores e que o efeito não é devido à libertação de glutamato endógeno (que também actua sobre os receptores de NMDA). Pode assim concluir-se que o ácido cainico in vitro eleva os níveis de ARNm do BDNF através de receptores de glutamato não-NMDA.



---

QUADRO VI  
EFEITO DE VÁRIOS AGONISTAS DE RECEPTORES SOBRE A EXPRESSÃO  
DO ARNm DO BDNF EM NEURÓNIOS DE CULTURAS

| <u>Adição</u>                       | <u>% do controle</u> |
|-------------------------------------|----------------------|
| nenhuma                             | 100 ± 5              |
| carbacol (50 µM)                    | 220 ± 25             |
| carbacol (50 µM) + atropina (10 µM) | 85 ± 15              |
| nicotina (100 µM)                   | 110 ± 7              |
| histamina (50 µM)                   | 150 ± 12             |
| serotonina (100 µM)                 | 95 ± 6               |
| dopamina (100 µM)                   | 115 ± 7              |
| norepinefrina (25 µM)               | 75 ± 10              |
| substância P (1 µM)                 | 85 ± 9               |
| somatostatina (1 µM)                | 110 ± 8              |
| bradiquinina (1 µM)                 | 155 ± 15             |
| ácido cainico (25 µM)               | 1365 ± 70            |
| NMDA (25 µM)                        | 105 ± 10             |

---

---

QUADRO VII  
EFEITO DE ANTAGONISTAS DOS DIFERENTES RECEPTORES DE  
GLUTAMATO SOBRE A EXPRESSÃO DO ARNm DO BDNF INDUZIDA  
PELO ÁCIDO CAÍNICO

| <u>Adição</u>                                    | <u>% do controle</u> |
|--------------------------------------------------|----------------------|
| nenhuma                                          | 100 ± 60             |
| ácido cainico (25 µM)                            | 1250 ± 60            |
| ácido quinurénico (1 mM)                         | 70 ± 6               |
| ácido quinurénico (1 mM) + ácido cainico (25 µM) | 84 ± 7               |
| CNQX (10 µM)                                     | 109 ± 6              |
| CNQX (10 µM) + ácido cainico (25 µM)             | 105 ± 7              |
| MK-801 (5 µM)                                    | 96 ± 5               |
| MK-801 (5 µM) + ácido cainico (25 µM)            | 1130 ± 80            |

---



Para avaliar o grau de significância fisiológica das nossas observações, fomos verificar se também operavam in vivo mecanismos semelhantes. Trataram-se ratos Wistar, adultos, de ambos os sexos, pesando de 180 a 200 g, com 12 mg/kg de ácido cainico. Após vários períodos de tempo, determinámos as variações dos ARNms do BDNF e NGF no hipocampo e no córtex por análise de mancha Northern. A Fig. 19 mostra que o ácido cainico eliciou um aumento nos níveis dos ARNms do BDNF e NGF em ambas as regiões do cérebro. O aumento do ARNm do BDNF foi substancialmente maior do que o do ARNm do NGF. Além disso, mesmo após 24 h depois da administração do ácido cainico, os níveis de ARNm mantiveram-se elevados. O decurso das alterações dos ARNms do BDNF e NGF mostrou que o aumento máximo no hipocampo era alcançado aproximadamente 3 h depois da administração do ácido cainico (Fig. 19). É interessante notar que o aumento dos ARNms do BDNF e NGF no hipocampo foi precedido por um aumento no c-fos-ARNm; os dois fenómenos podem estar relacionados de modo causal, como recentemente se mostrou no caso do nervo ciático após lesão (Hengerer et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:3899). Além disso, há um atraso no aumento dos ARNms de ambos, BDNF e NGF, no córtex cerebral comparado com o aumento no hipocampo, o que indica que o sinal que conduz a uma expressão aumentada no BDNF e NGF se espalha do hipocampo para outras regiões do cérebro. Este reparo concorda com relatórios anteriores (Morgan et al., 1987, Science 237:192) que mostram que o aumento em c-fos eliciar pelo metrazolo convulsivante ocorreu primeiro no hipocampo e depois no córtex.

Depois de estudos anteriores terem evidenciado que os receptores de NMDA estão implicados na regulação dos ARNms do hipocampo, como p. ex. o NGFI-A (Cole et al., 1989, Nature 340:474), fomos então verificar se os antagonistas dos receptores de NMDA, MK801 e quetamina, bloqueariam ou não o aumento dos ARNms do BDNF e NGF, in vivo. Contudo, confirmando os nossos resultados in vitro, o MK801 não inibiu o aumento, mediado pelo ácido cainico, do ARNm do BDNF no hipocampo, ainda que suprimisse eficazmente convulsões resultantes da activação do receptor de



NMDA (Fig. 20). Muito provavelmente esta activação do receptor de NMDA resulta do glutamato endógeno libertado pelo ácido cainico (Biziere, K. and Coyle, T., *Neurosci.*, 1978, *Lett.* 8:303; McGeer et al., 1978, *Brain. Res.* 139:381). De modo semelhante, o aumento de ARNm do NGF no hipocampo após tratamento pelo ácido cainico não foi evitado pelo MK801 nem pela quetamina. Num estudo anterior (Gall, C.M. and Isackson, P.J., 1989, *Science* 245:758), mostrou-se que as lesões electrolíticas que provocam convulsões límbicas elevam o ARNm do NGF no hipocampo do rato. Os resultados presentes, obtidos com o MK801 e ácido cainico, mostraram contudo uma nítida dissociação entre a indução de convulsões e os aumentos de expressão no BDNF e NGF. O tratamento de ratos com diazepam (Valium) antes das injecções de ácido cainico, bloqueou completamente o aumento dos ARNms do BDNF e NGF no hipocampo do rato (Figura 20). O efeito bloqueador do diazepam sobre o aumento do ARNm do BDNF e NGF resulta, muito provavelmente, da supressão da actividade neuronal através do sistema inibidor GABAérgico. Contudo, 90 minutos depois da administração de ácido cainico (i.e., aproximadamente 30 min depois do começo das convulsões) o aumento do ARNm do BDNF e NGF já não era mais bloqueado pelo diazepam, o que indica que um período relativamente curto de actividade aumentada pode ser suficiente para iniciar acontecimentos em cascata conduzindo a uma expressão aumentada dos ARNms dos dois factores neurotróficos.

A presente investigação mostrou que os receptores não-NMDA podem estar implicados na regulação do ARNm do BDNF e NGF no hipocampo, distinguindo-se assim este mecanismo regulador do anteriormente descrito por Cole et al. (Cole et al., 1989, *Nature* 340:474) que concluíram que os ARNms do hipocampo que codificam genes no seu início parecem ser regulados através dos receptores de glutamato de subtipo NMDA. Tem sido relatado que alguns dos efeitos do ácido cainico sobre os neurónios podem também ser mediados pelos receptores de glutamato do tipo quisqualato (Monaghan et al., 1989, *Annu. Rev. Pharmacol., Toxicol.* 29:365).

Em conclusão, o presente estudo mostrou que a actividade neuronal regula os níveis dos ARNms codificadores dos factores



neurotróficos BDNF e NGF no hipocampo e no córtex do rato. De todas as substâncias ensaiadas, o ácido cainico, actuando via receptores de glutamato não-NMDA, elevou os ARNms do BDNF e NGF tanto in vivo como nas culturas neuronais do hipocampo. Em contraste, na periferia não há evidência de que a síntese do NGF em células não neuronais seja regulada pelas substâncias transmissoras convencionais ou por neuropéptidos libertados por neurónios de inervação (sensíveis ao NGF) (Barth et al., 1984, J. Cell Biol. 99:839; Hellweg et al., 1988, Exp. Cell Res. 179:18). O BDNF está expresso predominantemente no SNC e há pelo menos uma sobreposição parcial entre os circuitos centrais, usando glutamato como um neurotransmissor, e regiões que se mostram ser relativamente ricas em ARNm de BDNF e NGF (Hofer et al., EMBO J., in press; Monaghan et al., 1989, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29:365). Em particular, há semelhanças surpreendentes entre a distribuição do ARNm do NGF, como se demonstrou por hibridação in situ (Hofer et al., EMBO J., in press) e a dos receptores do ácido cainico, visualizadas por auto-radiografia no hipocampo, córtex cerebral e cerebelo (Monaghan et al., 1989, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29:365). As observações realizadas são compatíveis com a interpretação de que o glutamato representa o transmissor fisiológico que regula os ARNms do BDNF e NGF no SNC.

16. EXEMPLO: O FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO  
AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA E FUNÇÕES DIFERENCIADAS DOS  
NEURÓNIOS COLINÉRGICOS SEPTAIS DO RATO, EM CULTURA

16.1. MATERIAIS E MÉTODOS

16.1.1. PREPARAÇÃO DE CÉLULAS DISSOCIADAS E CONDIÇÕES  
DE CULTURA DE CÉLULAS

A região septal de ratos (Sprague-Dawley) após 17 dias de gestação, foi dissecada de modo a ficar livre dos tecidos circundantes. Misturaram-se os fragmentos de tecidos, lavaram-se por 3 vezes com F-10 de Ham e depois transferiram-se para uma placa de 35 mm, de cultura de tecidos onde foram cortados. Fez-se uma única suspensão de células isoladas, por incubação do tecido com 0,25% tripsina durante 20 min a 37°C. Depois da inactivação da tripsina por uma incubação à temperatura ambiente, durante 5



min, em meio de crescimento (infra), contendo 50 µg/ml desoxirribonuclease tipo 1 (Sigma), as células foram dissociadas passando repetidamente os fragmentos por uma pipeta de Pasteur de ponta afilada. As células dissociadas foram então centrifugadas a 500 x g durante 45 s. O sobrenadante foi removido e recentrifugado. Os pelletizados de células soltas foram ressuspensos e juntos no meio de crescimento e determinou-se a produção de células, pelo uso de um hemocitómetro. Finalmente as células foram colocadas em placa, em poços de 6 mm que tinham sido revestidos com poliornitina (10 µg/ml) e laminina (10 µg/ml). Verificou-se a viabilidade das células, após 24 h em cultura, pela capacidade das células rejeitarem o azul de tripano.

O meio normal de crescimento, 5HS/N3, para culturas compostas por neurónios e glia, continha: 5% (v/v) soro de cavalo (Gibco), 1% aditivos N3 (v/v) (Romijn et al., 1982, Dev. Brain Res. 2:583-589), 0,5% (v/v) glutamina (200 mM, Gibco) e 0,25% (v/v) penicilina-estreptomicina (10 000 unidades/ml, 10 000 mcg/ml respectivamente, Gibco) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Prepararam-se culturas enriquecidas em neurónios substituindo o meio de crescimento, 5 a 6 h após colocação em placa, com DMEM contendo: 1% aditivos N3, 0,5% glutamina e 0,25% penicilina e estreptomicina. Em ambas as condições usou-se o tratamento com arabinósido de citosina (1 µM durante 24 h) para limitar a proliferação de células gliais.

#### 16.1.2. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE DA ACETILCOLINA-TRANSFERASE

Retirou-se o meio de crescimento das culturas por lavagem das células por 2 vezes com 100 µl de PBS. As células foram lisadas por um ciclo de congelação-descongelação e por uma incubação de 15 min a 37°C em 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,7, contendo 200 mM NaCl e 0,25% (v/v) Triton X-100. Retiraram-se do lisado de células 2 µl e avaliou-se a sua actividade CAT de acordo com o processo micro-Fonnum (Fonnum, F, 1975, J. Neurochem. 24:407-409). A composição do substrato final consistia em 0,2 mM [ $^{14}\text{C}$ ] Acetil-CoA (NEN, 54,4, mCi/mmol, 300 mM NaCl, 8 mM brometo de colina, 20 mM ácido etilenodiaminotetraacético e 0,1 mM neostigmina em tampão de 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4). A estas concentra-

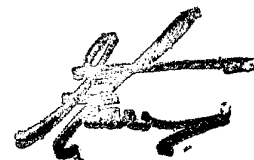
ções do enzima e do substrato, a reacção enzimática foi linear durante 90-120 min. A especificidade da indução da acetilcolina-transferase foi ensaiada pela adição de um inibidor específico da actividade da CAT, o N-hidroxietil-4-(1-naftilvinil)piridíio (HNP), durante a avaliação (White, H.L. e Cavallito, C.J., 1970, J. Neurochem. 17:1579-1589).

#### 16.1.3. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE DA ACETILCOLINA- ESTERASE (AChE)

O nível de AChE presente nos lisados foi medido pelos métodos de Potter (Potter, L.T., 1967, J. Pharmacology and Experimental Therapeutics 156:500-506) e Johnson e Russell (Johnson, C.D. e Russell, R.L., 1975, Anal. Biochem. 64:229-238) com algumas modificações. Os lisados preparados em tampão de 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,7, contendo 200 mM NaCl e 0,25% (v/v) Triton X-100, foram juntos a [ $^3\text{H}$ ]iodeto de acetilcolina (NEN, NET-113, 73,3 mCi/mmol), etopropazina (0,1 mM) em 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0. Após uma incubação de 15 min a 37°C, a reacção foi terminada pela adição de 100  $\mu\text{l}$  de uma solução de tampão de paragem contendo: 1 M ácido cloroacético, 0,5 M NaOH e 2,0 M NaCl. A actividade específica da AChE foi determinada na presença de 1,0 ( $10^{-6}$ )M neostigmina.

#### 16.1.4. MEDIDA DA TOMADA DE COLINA POR ALTA AFINIDADE

A tomada de colina por um mecanismo  $\text{Na}^+$ -dependente, de alta afinidade, foi avaliada essencialmente pelo processo de Vaca e Pilar, 1979 (Vaca, K. e Pilar, G., 1979, J. Gen. Physiol. 73:605-628). As células foram lavadas uma vez com 100  $\mu\text{l}$  de F-10 de Ham, seguindo-se uma lavagem com 100  $\mu\text{l}$  de solução de Tyrodes. Depois de uma despolarização, de 10 min, induzida pela solução de Tyrodes contendo 25 mM potássio, as células foram incubadas durante 20 min à temperatura ambiente com [ $^3\text{H}$ ]colina (NEN, NET-109, 0,11  $\mu\text{M}$ , 86,7 Ci/mmol) em solução normal de Tyrodes contendo  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Li}^+$ . A reacção de tomada foi parada lavando as células por 2 vezes com PBS. A colina acumulada foi extraída incubando as culturas durante pelo menos 20 min com 100  $\mu\text{l}$  de acetona fria contendo ácido fórmico 1 N. A fracção solúvel foi então retirada e contada. A tomada específica de colina é a diferença entre o



nível da tomada total e a tomada de colina independente de  $\text{Na}^{+-}$ .

#### 16.1.5. MARCAÇÃO HISTOQUÍMICA PELA ACETILCOLINAESTERASE

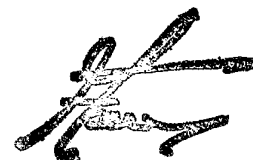
As células colinérgicas foram identificadas por marcação histoquímica pela acetilcolinaesterase por uma modificação do método de marcação de Geneser-Jensen e Blackstadt, (1971, Z. Zellforsch. 114:460-481). Depois da fixação das culturas em 4% paraformaldeído, as células foram incubadas 5-6 dias a 4°C na presença da solução de substrato de AChE composta do seguinte: 4 mM acetiltiocolina-iodo, 2 mM sulfato de cobre, 10 mM glicina e 10 µg/ml gelatina em tampão 50 mM de acetato, pH 5,0. A visualização do produto de reacção foi obtida como anteriormente se descreveu (Hartikka, J. e Hefti, F., 1988, J. Neurosci. 8:2967-2985).

#### 16.1.6. MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PELO RECEPTOR DE NGF

As culturas foram lavadas por 2 vezes com DMEM e depois fixadas com 4% paraformaldeído. As células foram depois tratadas durante 3-4 h com um tampão de fosfato de sódio pH 7,4 contendo 5% albumina de soro bovino, 0,02% triton X-100 e 5% sacarose (Hartikka, J. e Hefti, F., 1988, J. Neurosci. 8:2967-2985). O receptor de NGF (NGF-R) foi detectado utilizando o anticorpo monoclonal 192-IgG (Taniuchi, M. e Johnson, E., 1985, J. Cell Biol. 101:1100-1106; Chandler et al., 1984, J. Biol. Chem. 259:6882-6889), a uma diluição 1:1000 em tampão contendo 5% soro de cavalo. As culturas foram incubadas com o anticorpo diluído durante 15-18 h a 4°C. A imunoglobulina ligada do ratinho foi detectada utilizando IgG anti-ratinho de cavalo biotilado (1:200 Vector). As células imuno-reactivas foram identificadas usando 3',3'-diaminobenzidina como substrato para o enzima peroxidase ligado.

#### 16.1.7. PURIFICAÇÃO DO BDNF E NGF

A purificação do BDNF a partir de cérebro de porco e a do NGF a partir da glândula submaxilar de ratinho macho, foram conduzidas de acordo com protocolos já publicados (Barde et al., 1982, EMBO J. 1:549-553; Lindsay et al., 1985, Dev. Biol. 112:319-328). O BDNF recombinante, usado para uma parte destes



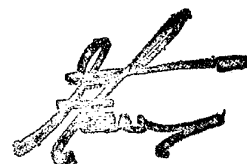
estudos, foi caracterizado anteriormente (Maisonpierre et al., 1990, Science. 247:1446-141).

## 16.2. RESULTADOS

Culturas de células septais produziram o crescimento de neurites elaboradas em poços revestidos de poliornitina-laminina com muitas células mostrando em fase brilhante um soma neuronal característico às 24 h (Figura 21A e B). O crescimento continuado de neurites resultou num aumento progressivo na extensão do contacto célula-célula, aos dias 2 e 4 in vitro (comparar na Figura 21 C, D com E, F). Havia muito poucas células não neuronais nas culturas mesmo após 4 dias, o que era notado pela ausência de células achatadas em fase escura. Para avaliar os efeitos do BDNF na sobrevivência, em cultura, de neurónios colinérgicos septais, usou-se uma marcação histoquímica pela AChE e uma marcação imuno-histoquímica pelo receptor de NGF. As morfologias típicas dos neurónios positivos à AChE estão indicadas na Figura 21 G, H. Vários neurónios positivos ao receptor de NGF estão indicados na Figura 21 I.

O BDNF provocou um aumento de 2,4x no número de células positivas à AChE em culturas de baixa densidade (definidas como densidades de células entre 66 700 e 133 300 células/cm<sup>2</sup>) de células septais de rato embrionário, como se mostra na Figura 22A. As mesmas densidades de células o efeito do NGF foi ligeiramente inferior (1,9x). A descoberta de que tanto o BDNF como o NGF podem produzir um aumento do número de neurónios positivos à AChE em culturas septais sugeriram-nos averiguar se estes dois factores actuam sobre populações neuronais semelhantes ou distintas. Como se mostra no terceiro painel da Figura 22 A, a adição simultânea de níveis saturantes de BDNF e NGF não conduz a um aumento maior do número de neurónios positivos à AChE do que o observado com qualquer dos factores sózinho. Em termos de sobrevivência neuronal, estes resultados sugerem que os neurónios colinérgicos em culturas septais de ratos que respondem ao BDNF ou ao NGF devem ser populações parcialmente justapostas.

O efeito do BDNF na sobrevivência de neurónios positivos à



AChE foi dependente da densidade à qual as células se desenvolveram (Figura 22A). A densidades de placa elevadas (200 000 - 266 000 células/cm<sup>2</sup>) nem o BDNF sózinho nem em combinação com o NGF produziu um aumento do número de neurónios que expressam a AChE. Isto pode ser devido aos elevados níveis endógenos de actividade neurotrófica ou, em alternativa, aos efeitos promotores da sobrevivência do contacto aumentado célula-célula que ocorre às densidades mais elevadas de células.

A uma densidade baixa de células, o número de células positivas à AChE aumentou em função da concentração do BDNF, com uma resposta máxima observada a uma dose de 10 ng/ml, a qual aumentou o número de células positivas à AChE/poço a partir de valores de controlo de  $169,2 \pm 12,9$  até  $388,0 \pm 26,2$  (um aumento de 2,5x) em culturas tratadas. Em comparação, observou-se uma resposta máxima ao NGF aos 50 ng/ml e obteve-se um aumento de células positivas à AChE/poço a partir de  $121,0 \pm 7,6$  até  $231,7 \pm 12,9$  (um aumento de 1,9x). A fase estacionária na curva de resposta pareceu estável tanto para o BDNF como para o NGF, pois que não havia redução no número de neurónios positivos à AChE a doses <sup>tão</sup> elevadas como 100 ng/ml.

Aparentemente, em culturas de baixa densidade, tanto o BDNF como o NGF são capazes de aumentar o número de células detectadas por histoquímica de AChE. É possível que este aumento seja devido à recuperação de células colinérgicas que estejam a morrer na cultura por ausência do factor de crescimento, ao recrutamento de células precursoras ou à indução do marcador colinérgico, AChE. Para tentar distinguir estas possibilidades, realizaram-se experiências de adição retardada (Figura 23) em séries de culturas mantidas num total de 12 dias. Um conjunto de culturas, tratadas 5 a 6 h após colocação em placa, foi mantida na presença de BDNF ou NGF durante todo o período de 12 dias. Criou-se um segundo grupo de culturas, sem factores de crescimento, durante 5 dias e depois trataram-se com BDNF ou NGF nos últimos sete dias (-5/+7). Quando se comparam os dois conjuntos de culturas a resposta ao NGF ou ao BDNF, adicionados após 5 dias, era muito parecida com a que foi observada quando as células cresceram



continuamente na presença dos factores (comparem-se as barras a cheio e a tracejado na Figura 23). Os resultados foram muito diferentes, contudo, num terceiro conjunto de culturas onde o BDNF ou o NGF estiveram apenas presentes nas culturas dos últimos 5 dias (-7/+5). Nestas condições, nem o NGF nem o BDNF foram capazes de aumentar o número de células positivas à AChE. Em outras experiências, verificou-se que a exposição de neurónios septais quer ao NGF quer ao BDNF, por pouco tempo, 3-4 dias, é suficiente para produzir um grande aumento da actividade da enzima AChE e, portanto, para detectar células por marcação pelo AChE. Vê-se assim que a ausência de um aumento detectável no número de neurónios positivos à AChE nas culturas "-7/+5" não era devida à possibilidade de que o tempo de exposição ao factor de crescimento fosse insuficiente para permitir uma indução de células positivas à AChE.

Demonstrou-se (Montero, C. and Hefti, F., 1988, J. Neurosci. 8:2986-2999; Higgins et al., 1989, Neuron. 3:247-256) que o NGF tanto in vivo como in vitro é capaz de regular os níveis do seu próprio receptor medidos quer ao nível do ARNm quer ao da proteína. Uma vez verificado que o BDNF mostra efeitos semelhantes aos do NGF na indução do fenotipo colinérgico e na sobrevivência de células em culturas septais, fomos ensaiar a potencialidade do BDNF poder regular os níveis do receptor do NGF, quantificados pelo número de células imunopositivas ao IgG-192. Aos 10 ng/ml, o BDNF produziu um aumento de 3x o número de células imunopositivas ao receptor de NGF, como se mostra na Figura 24. É interessante notar que a concentrações mais elevadas (25-100 ng/ml) o efeito do BDNF é progressivamente menos marcado. Assim, a dose - resposta neste caso foi notavelmente diferente da observada no efeito do BDNF sobre outros parâmetros nestas culturas, p. ex., sobre o número de células positivas à AChE. Como controlo positivo, as células foram tratadas com NGF a uma concentração de 50 ng/ml que também resultou num aumento de 3x o número de células positivas. Portanto, com base na marcação do IgG-192, o BDNF tem um efeito aproximadamente igual ao do NGF na melhoria da regulação da expressão do receptor do NGF.



Além dos efeitos sobre a sobrevivência de células, investigou-se a possibilidade do BDNF promover características fenotípicas colinérgicas. Observou-se um aumento linear na actividade da CAT em culturas septais desenvolvidas na presença de níveis crescentes de BDNF até 50 ng/ml, onde a resposta saturou a um nível de 1,8x os valores de controlo, como se mostra na Figura 25. A indução da actividade da CAT em culturas paralelas tratadas com NGF alcançou uma plataforma aos 25 ng/ml, o que representa um aumento de 3,4x os valores de controlo. As respostas, quer ao BDNF quer ao NGF, não mostraram nenhum declínio significativo a 3x a concentração suficiente para produzir uma resposta de saturação. A indução da actividade da CAT quer com BDNF quer com NGF não afectaram o nível da transferase independente do HNP, [N-hidroxietil-4-(1-naftilvinil)piridio].

A luz do facto de tanto o BDNF como o NGF produzirem um aumento de actividade da CAT em culturas septais, estudou-se a resposta ao tratamento simultâneo pelos dois factores (Quadro VIII). Para estas experiências usaram-se duas concentrações de BDNF, 5 e 25 ng/ml, que aumentaram a actividade da CAT em 1,4x e 2,6x respectivamente. Quando o NGF (50 ng/ml), que sózinho aumentava a actividade do enzima em 2,8x, foi combinado com BDNF, o nível de actividade da CAT reflectiu pelo menos um efeito aditivo (Quadro VIII). As concentrações de BDNF usadas, um efeito puramente aditivo ao do NGF teria conduzido a aumentos de 4,2 e 5,4x, respectivamente, em relação aos valores de controlo. Os valores observados foram na realidade um pouco mais do que aditivos.



---

QUADRO VIII  
EFEITOS DA CO-ADIÇÃO DE BDNF E NGF SOBRE A ACTIVIDADE DA CAT

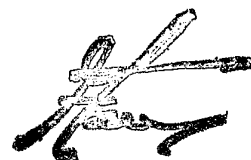
| <u>Concentração (ng/ml)</u> | <u>Actividade da CAT</u><br><u>(pmol/h/poço)</u> | <u>% controlo</u> |
|-----------------------------|--------------------------------------------------|-------------------|
| controlo                    | 561,3 ± 34,8                                     | -----             |
| NGF(50)                     | 1546,3 ± 89,7                                    | 280               |
| BDNF(5)                     | 768,0 ± 25,4                                     | 140               |
| BDNF(25)                    | 1470,1 ± 66,2                                    | 260               |
| NGF(50) + BDNF(5)           | 2767,6 ± 177,2                                   | 490               |
| NGF(50) + BDNF(25)          | 3742,0 ± 669,3                                   | 670               |

---

As células septais foram desenvolvidas durante um periodo de 12 dias em 5HS/N3 na presença das concentrações indicadas dos factores tróficos. A actividade da CAT foi determinada conforme se descreveu. Os valores representam as médias ± S.E.M. de 4-5 determinações.

---

Verificou-se se a possibilidade da resposta biológica observada com o tratamento pelo BDNF era devida a uma libertação, dependente do BDNF, de NGF endógeno. Para examinar esta questão, usou-se um anticorpo, contra NGF, monoclonal (anticorpo 27/21, Korsching e Thoenen, 1983) para bloquear qualquer resposta relacionada com o NGF. Como se mostra no Quadro IX, o efeito do NGF sobre a actividade da CAT foi muito reduzida pelo anti-NGF, enquanto que a resposta induzida pelo BDNF não foi essencialmente afectada. Note-se porém que o nível básico da actividade da CAT foi reduzida em cerca de 20% em culturas tratadas com anti-NGF sózinho quando se compara com os controlos não tratados. Apesar disso, o aumento observado da actividade da CAT em culturas septais produzido pelo BDNF parece ter um efeito directo e não mediado por um aumento de NGF endógeno.



---

QUADRO IX  
EFEITO DO ANTI-NGF SOBRE A CAPACIDADE DO NGF E BDNF  
INDUZIREM A ACTIVIDADE DO ENZIMA CAT

Actividade da CAT

| <u>Concentração (ng/ml)</u> | <u>(pmol/h/poço)</u> | <u>% controlo</u> |
|-----------------------------|----------------------|-------------------|
| Controlo                    | 517,53± 3,2          | —                 |
| BDNF(25)                    | 1021,6 ±106,1        | 197               |
| NGF(50)                     | 1139,0 ± 99,1        | 220               |
| Controlo + Anti-NGF         | 418,7 ± 27,0         | 81                |
| BDNF + Anti-NGF             | 819,2 ± 68,8         | 158               |
| NGF + Anti-NGF              | 551,0 ± 27,0         | 107               |

-----

Depois de um periodo de 12 dias de crescimento em 5HS/N3, na presença das concentrações indicadas dos factores tróficos, as células septais (colocadas em placa a uma densidade de 2,3 (10<sup>5</sup>) células/cm<sup>2</sup>) foram recolhidas. Determinou-se a actividade da CAT conforme se descreveu na secção dos Processos Experimentais. Os valores representam a média ± S.E.M. de 6 determinações.

Também se verificou a possibilidade da actividade do AChE ser regulada coordenadamente a par da actividade da CAT pelo BDNF ou pelo NGF (Figura 26). Em contraste com a actividade da CAT, a dose de resposta do AChE ao BDNF ou NGF mostrou-se bastante semelhante pois que a actividade do enzima aumentou linearmente até uma concentração de 50 ng/ml. A esta concentração o NGF e o BDNF aumentarem a actividade do AChE 274% e 234% respectivamente, quando se compara com os valores de controlo não tratados.

Investigou-se o decurso do aumento induzido pelo BDNF ou NGF na actividade da CAT (Figura 27). A actividade da CAT em culturas tratadas com 50 ng/ml de BDNF aumentou até 170% dos valores de controlo, durante 3 dias. Este aumento continuou até ao 6º dia, altura em que estabilizou a 2,5x os valores do controlo, ao longo do restante periodo de ensaio. Em contraste, a resposta da CAT à administração de NGF (50 ng/ml) foi mais rápida, alcançando



o nível induzido 2,5x o do controlo, no 3º dia. O aumento da actividade da CAT continuou a subir linearmente, alcançando um valor de 3,2x os dos controlos, após 12 dias.

Os astrócitos, desenvolvidos em cultura durante certo tempo, mostraram sintetizar várias actividade neurotróficas, alén do NGF (Lindsay, R.M., 1979, *Nature* 282:80-82; Lindsay et al., 1982, *Brain Res.* 243:329-343; Alderson et al., 1989, *Dev. Brain. Res.* 48:229-241). Ainda que tenhamos excluído a possibilidade de que as nossas observações sobre o BDNF tenham sido mediadas através de um aumento dos níveis de NGF, é concebível que o BDNF possa actuar indirectamente por modulação da expressão de outros factores neurotróficos, especialmente em células gliais. Para estimar a possibilidade de células não neuronais influenciarem o efeito do BDNF sobre a actividade da CAT em culturas septais, comparámos a resposta dos neurónios colinérgicos ao BDNF em culturas mistas gliais-neuronais e em culturas enriquecidas em neurónios (Figura 28). Nas culturas enriquecidas em neurónios, a resposta da actividade da CAT ao BDNF mostrou uma curva em forma de sino; alcançou-se um aumento máximo a uma dose de 5 ng/ml de BDNF, e a uma concentração de 25 ng/ml havia um declínio significativo da actividade enzimática ( $p > 0,001$ , comparando com 15 a 25 ng/ml de BDNF). De resultado semelhante ao indicado na Figura 25, a resposta da CAT ao BDNF, na presença de uma camada glial confluyente, foi linear, neste caso até 25 ng/ml de BDNF, dose máxima usada. Na presença de células não neuronais foram necessários níveis mais elevados de BDNF para produzir um aumento equivalente na actividade da CAT, em relação aos obtidos em culturas enriquecidas com neurónios tratados de modo semelhante. Ainda assim, a capacidade do BDNF estimular ao máximo a actividade da CAT em neurónios colinérgicos septais foi essencialmente a mesma na presença ou na ausência de células gliais.

Com base na actividade da CAT e do AChE, deduz-se que o BDNF pode actuar de modo semelhante ao NGF na melhoria dos marcadores fenotípicos colinérgicos. Para examinar ainda este assunto, comparou-se o efeito do BDNF sobre o nível de tomada de colina de



elevada afinidade,  $\text{Na}^+$ -dependente, com o do NGF (Figura 29). Células crescidas durante 12 dias na presença de 50 ng/ml de BDNF, acumularam colina até um nível 3,8x o dos controlos não tratados. Em culturas paralelas, o NGF (25 ng/ml) induziu um aumento de 2,3x na acumulação de colina.

### 16.3. DUSCUSSÃO

Em comparação com os seus já demonstrados efeitos sobre os neurónios periféricos (Barde et al., 1982, EMBO J. 1:549-553; Lindsay et al., 1985, Dev. Biol. 112:319-328; Davies et al., 1986, J. Neurosci. 6:1897-1904; Hofer, M, e Barde, Y., 1988, Nature 331:262-262), a especificidade neuronal do BDNF dentro do sistema nervoso central está menos bem caracterizada. Até à data, os únicos neurónios sensíveis do sistema nervoso central já conhecidos constituem uma pequena subpopulação de células do gânglio da retina, positivas à Thy-1, primeiramente identificadas em culturas de retina do rato E17 (Johnson et al., 1986, J. Neurosci. 6:3031-3038). Outros estudos demonstraram também os efeitos do BDNF sobre as células do gânglio da retina do adulto em culturas de explante (Thanos et al., 1989, Eur. J. Neuro. 1:19-26). Neste estudo demonstrámos que o BDNF aumenta a sobrevivência de neurónios colinérgicos de cultura a partir do septo do rato embrionário, como se mostrou pela marcação histoquímica pela AChE, e aumenta a expressão de vários marcadores fenotípicos colinérgicos, isto é, a actividade enzimática do AChE e da CAT e a tomada de colina de alta afinidade. Além disso, verificou-se que o BDNF aumenta a expressão do receptor de NGF em culturas septais.

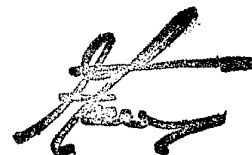
Nas experiências iniciais, descobrimos que o BDNF aumentava o número de neurónios positivos à AChE em culturas septais de E17, em aproximadamente 2x. Como no caso do NGF (Hartikka, J. and Hefti, F., 1988, J. Neurosci. 8:2967-2985) este efeito era mais visível em densidades celulares baixas. Tem interesse notar que a co-adição de NGF e BDNF foi ineficaz para aumentar ainda mais o número de células positivas ao AChE nos níveis observados na presença de qualquer dos factores de crescimento. Esta observação sugere fortemente que o BDNF e o NGF actuam largamente



sobre a mesma população de neurónios septais colinérgicos.

Como inicialmente se disse para o NGF (Hefti et al., 1985, *Neuroscience* 1:55-68), o BDNF não melhorou a sobrevivência de neurónios colinérgicos em culturas estabelecidas a densidades celulares relativamente elevadas. Em proporção às células colocadas em placa, verificou-se que a sobrevivência de neurónios colinérgicos era mais elevada a uma densidade celular elevada do que a uma densidade celular baixa, mesmo na ausência de qualquer factor neurotrófico. Há várias explicações possíveis para este caso incluindo o contacto célula-célula aumentado, os efeitos benéficos do número acrescido de células não neuronais ou um aumento mais que proporcional da actividade neurotrófica endógena. Quanto a esta última possibilidade, não encontramos nenhuma indicação de níveis substancialmente aumentados de NGF endógeno pois que a adição de um excesso de anti-NGF a culturas de densidade elevada, não tratadas, apenas reduziu a actividade de base da CAT em 20%. Nestas culturas, o NGF exógeno foi capaz de produzir um grande aumento de 3,4x a actividade da CAT.

Há agora muitos relatórios, tanto sobre o nível de proteína como de ARNm, que indicam que o NGF pode melhorar a regulação da expressão do seu próprio receptor tanto em neurónios de cultura como in vivo. Neste estudo, usámos o anticorpo monoclonal IgG-192 para detectar o receptor de NGF. Este monoclonal foi já caracterizado tanto nos neurónios sensitivos do rato como no cérebro do rato (Taniuchi, M. and Johnson, E., 1985, *J. Cell Biol.* 101:1100-1106). Além de confirmar os resultados de Hartikka e Hefti de que o NGF pode melhorar a regulação do nível do seu receptor em culturas septais, o que se nota pelo aumento do número de neurónios imunopositivos ao IgG 192, verificámos ainda que o BDNF aumenta o número de células imunopositivas ao IgG-192 até cerca de 3x. A resposta ao BDNF foi bifásica pois que a elevadas concentrações, da ordem dos 25-100 ng/ml, não conseguiu produzir um aumento tão grande do número de células positivas como o que se notou aos 10 ng/ml. É interessante notar que este tipo de resposta à dose foi bastante diferente do observado para o aumento, induzido pelo BDNF, do número de neurónios positivos



ao AChE. Neste último caso não se observou nenhuma redução do efeito máximo do BDNF a altas concentrações. Deve notar-se que se mostrou recentemente que o receptor do NGF de baixa afinidade também se liga ao BDNF com afinidade semelhante, sugerindo que os receptores de baixa afinidade do NGF e do BDNF podem ser idênticos (Rodriguez-Tebar et al., 1990, Binding of Brain-Derived Neurotrophic Factor to the Nerve Growth Factor Receptor Neuron. 4, 487-492).

Possíveis semelhanças no mecanismo de acção do BDNF e do NGF foram sugeridas pela descoberta de que o BDNF era equipotente com o NGF na indução da actividade da AChE. Ainda que se tivesse verificado que o BDNF também promovia a sobrevivência de neurónios colinérgicos com intensidade semelhante à do NGF, o efeito do BDNF sobre a actividade enzimática da CAT não foi tão grande como o do NGF. Ao longo de várias experiências, a indução máxima da CAT pelo BDNF variou entre 1,8 a 2,6x enquanto que se observaram rotineiramente valores superiores a 3x com o NGF. Assim, ainda que haja algumas semelhanças nos mecanismos de acção do BDNF e NGF, é bastante provável que haja diferenças subtis na expressão e regulação dos seus receptores respectivos e na ligação destes receptores aos caminhos do mensageiro secundário necessários para induzir a actividade da CAT.

A suposição de que as diferenças ao nível da indução da actividade da CAT, produzida pelo BDNF ou NGF, poderiam representar caminhos reguladores diferentes foi ainda apoiada pelos resultados de estudos dos fenómenos ao longo do tempo. Neurónios septais de cultura responderam ao BDNF com uma subida da actividade da CAT até ao 6º dia, altura em que a resposta se mostrou estabilizar. Em contraste, a indução da actividade da CAT em resposta ao NGF mostrou um aumento linear prolongado do 3º ao 12º dia. A paragem na subida da indução da actividade da CAT no 6º dia em culturas tratadas pelo BDNF pode ser indicadora de uma alteração do desenvolvimento da expressão quer do receptor do BDNF quer de um dado componente no caminho de resposta. Dado que o número de neurónios colinérgicos (neurónios positivos à AChE) obtido em culturas de alta densidade após 12 dias se mostra



independente do BDNF ou NGF exógenos, parece improvável que diferentes tipos de morte das células neuronais possam explicar as diferenças observadas no decorrer do tempo, na indução da actividade da CAT por estes dois factores de crescimento.

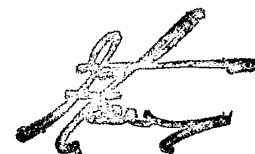
Nas experiências iniciais envolvendo o tratamento pelo BDNF de células colinérgicas do prosencéfalo basal, nenhuma hipótese foi feita quanto ao tipo de célula primária, neuronal ou glial, que respondia a este factor neurotrófico. Ainda que estudos realizados sobre culturas altamente enriquecidas de neurónios periféricos sugira fortemente que o BDNF tenha os seus efeitos directamente sobre os neurónios (Lindsay et al., 1985, Dev. Biol. 112:319-328; Lindsay, 1988, J. Neurosci. 7:2394-2405), é concebível que os efeitos neuronais do BDNF observados no presente estudo possam ter sido mediados através de uma primeira acção do BDNF sobre astroglia ou sobre outras células não neuronais. Contudo, verificou-se que o BDNF era igualmente eficaz na indução da actividade da CAT na presença de uma monocamada confluyente de células predominantemente astrogliais ou em culturas muito depauperadas de células gliais por tratamento com o inibidor mitótico, o arabinósido de citosina. Uma observação intrigante nestas experiências foi que o formato das curvas de resposta à dose de BDNF era distintamente diferente nos dois casos. Na presença de uma monocamada glial, a resposta do BDNF era linear em função da concentração crescente de BDNF. Nas culturas enriquecidas de neurónios, a resposta à dose de BDNF estava deslocada para a esquerda. Uma explicação possível para estes resultados é que as próprias glia podem expressar o receptor do BDNF, baixando assim a concentração efectiva do ligando disponível para o receptor localizado nos neurónios. Em alternativa, o efeito supressivo dos astrócitos poderia ser indirecto, não relacionado com um efeito sobre a concentração do ligando ou sobre a expressão do receptor, e mediado, p. ex., pela degradação muito aumentada do BDNF. Observações semelhantes foram feitas por Hartikka e Hefti (Hartikka, J e Hefti, F., 1988, J. Neurosci. 8:2967-2985) e Honegger e Lenoir (Honegger, P. e Lenoir, D., 1982, Dev. Brain Res. 3:229-238). Demonstrou-se que as células



gliais de diferentes regiões do cérebro podem influenciar muito a morfologia de neurónios associados com elas (Prochiantz et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:5387-5391; Prochiantz et al., 1981, Nature 293:570-572). Assim, as glia septais podem apresentar propriedades intrínsecas de natureza quer membranosa quer secretória que podem actuar na supressão da expressão do fenotipo colinérgico. As propriedades reguladoras dos astrócitos provenientes do hipocampo em condições de ensaio semelhantes, estão agora a ser investigadas.

Com base nos resultados apresentados, deduz-se que tanto o BDNF como o NGF são capazes de aumentar a função neuronal colinérgica septal. É interessante especular quanto à possível relevância fisiológica dos dois factores neurotróficos altamente homólogos actuando aparentemente sobre uma só população neuronal. Tem havido algumas sugestões de que as acções do BDNF e NGF se possam sobrepor inicialmente durante o início do desenvolvimento dos neurónios periféricos, especialmente sobre sub-populações de neurónios do gânglio da raiz dorsal ou dos seus precursores, e depois mais tarde se separarem para agirem independentemente sobre populações distintas (Lindsay et al., 1985, Dev. Biol. 112: 319-328; Ersberger, U. e Rohrer, H., 1988, Dev. Biol. 126:420-432); Barde, Y.A. 1989, Neuron. 2:1525-1534). Contudo, isto não foi definitivamente provado pelo uso de marcadores apropriados para se definirem sub-populações de neurónios sensitivos. Uma vez que o presente estudo focou os neurónios septais embrionários estabelecidos em cultura num só ponto do tempo de desenvolvimento, E17, é possível que uma espécie semelhante de fenómenos segregativos possa ocorrer em estágios posteriores do desenvolvimento do septo. Assim poderão provar-se interessantes diferenças temporais e espaciais na capacidade de resposta dos neurónios colinérgicos septais ao BDNF ou ao NGF.

Seria agora interessante examinar os efeitos do BDNF sobre neurónios colinérgicos in vivo do prosencéfalo basal pois que há agora evidência de que o NGF proveniente do hipocampo pode estar implicado no desenvolvimento normal e na manutenção de neurónios colinérgicos in vivo do prosencéfalo basal. Seria interessante



demonstrar se o BDNF tem ou não um papel semelhante in vivo. A recente descoberta de que o ARNm do BDNF é particularmente abundante no hipocampo apoia a existência desse papel.

## 17. EXEMPLO: CONVERSÃO ENZIMÁTICA DO PREPRO-BDNF EM BDNF MADURO E ACTIVO

### 17.1. MATERIAIS E MÉTODOS

A endoproteínase Arg-C existente no comércio (purificada a partir das glândulas submaxilares do ratinho) foi usada para converter enzimaticamente a grande forma precursora do hBDNF (prepro BDNF) em proteína madura biologicamente activa. Esta cisão enzimática foi conseguida numa reacção in vitro. O substrato da reacção enzimática foi o preproBDNF sintetizado em células CHO-DG44, que foi segregado para o meio de cultura de células e recolhido. O meio de cultura era constituído pelo meio F12 de Ham (isento de nucleósidos) com 1% de soro bovino fetal (FBS) e 1% cada de penicilina e estreptomicina. A reacção realizou-se a 37°C durante 5 min usando 5 unidades de enzima e 50 µl de sobrenadante de células CHO-DG44, contendo preprohBDNF. A cisão do preprohBDNF em hBDNF maduro foi completa nestas condições.

### 17.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

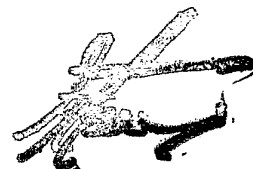
A forma prepro de hBDNF recombinante (aproximadamente 31 000 dalton) foi completamente processada na forma bioactiva madura de hBDNF (aproximadamente 12 000 dalton) in vitro, usando endoproteínase Arg-C. O factor neurotrófico derivado do cérebro humano, recombinante, foi já produzido com sucesso em células de mamíferos (células CHO-DG44). O gene de hBDNF foi integrado, de modo estável, no genoma das células CHO e o gene do hBDNF amplificado recorrendo à estratégia de amplificação pelo metotrexato. O hBDNF recombinante foi segregado no meio e verificou-se ser biologicamente activo. A marcação metabólica seguida de electroforese em gel de poliacrilamida com SDS (15% gel) demonstraram que a maior parte do produto sintetizado, hBDNF marcado com [<sup>35</sup>S], segregado para o meio de cultura, migrou como forma prepro com um peso molecular aparente de 31 000 (Figura 30, pista 2). As proteínas marcadas com [<sup>35</sup>S] segregadas pelo tipo



bravio de células CHO-DG44 estão indicadas na Figura 30, pista 1. A fim de criar predominantemente uma forma madura de hBDNF (peso molecular aparente de 12 000), planeámos uma estratégia in vitro para cindir enzimaticamente a forma prepro do hBDNF.

Os produtos da digestão pela tripsina estão indicados na Figura 30, pistas 3-6. A tripsina de pâncreas bovino (adquirida na Worthington; isenta de quimotripsina) foi dissolvida em soro salino tamponado com fosfato e adicionado a aliquotas de 50 µl de hBDNF de células CHO, marcado com [<sup>35</sup>S]. As concentrações de tripsina usadas foram de 25, 50, 75 e 100 µg/ml. Os produtos da reacção marcados com [<sup>35</sup>S] estão indicados nas pistas 3-6, respectivamente. A reacção de cisão enzimática foi realizada a 37°C durante 5 min. Observou-se um decréscimo gradual na intensidade de marcação do prepro-hBDNF 31 000 com um aumento correspondente de um produto de peso molecular 18 500. A forma madura do hBDNF (peso molecular 12 000) não foi criada nestas condições. A Figura 30, pista 7, mostra os produtos de reacção marcados com [<sup>35</sup>S] após digestão enzimática do hBDNF de células CHO com a endoproteínase Arg-C isolada da glândula submaxilar do ratinho, da Boehringer Mannheim Biochemicals, Inc.. 100 unidades deste enzima foram reconstituídas a partir de uma preparação liofilizada com 100 µl de água Milli-Q e guardadas a -20°C. Para a digestão enzimática do hBDNF de células CHO usámos 5 unidades (5 µl) de enzima e 50 µl de proteína, marcada com [<sup>35</sup>S], de sobrenadante de células CHO, contendo preprohBDNF (Figura 30, pista 2). Como se vê na Figura 30, pista 7, 5 unidades de endoproteínase Arg-C foram capazes de converter a forma prepro do hBDNF (peso molecular 31 000) na forma madura do hBDNF (12 000 de peso molecular) em 5 min, a 37°C.

O tratamento enzimático com endoproteínase Arg-C dos sobrenadantes de células CHO que expressem o hBDNF aumentou o nível da actividade biológica do BDNF em relação aos sobrenadantes não processados. Os sobrenadantes de células CHO-DG44 que expressam o hBDNF foram tratados durante 5 min com endoproteínase Arg-C, a 37°C. 200 µl de sobrenadante foram tratados com 20 unidades de enzima e tanto o hBDNF tratado como o não tratado



foram avaliados quanto à sua actividade biológica, usando explantes de gânglios da raiz dorsal do pinto E8. 24 h depois da adição do hBDNF, avaliou-se qualitativamente o crescimento de neurites. Verificámos que as amostras de BDNF tratadas pela endoproteinase eram significativamente mais bioactivas do que as amostras de hBDNF do controlo (não tratado). Na Figura 31 foi traçada uma curva de concentrações destes resultados.

Em conclusão, a endoproteinase Arg-C purificada pode ser usada numa reacção enzimática in vitro para criar a forma madura bioactiva do factor neurotrófico proveniente do cérebro humano, recombinante, a partir de moléculas precursoras incompletamente processadas (isto é, proBDNF). Este novo método permitirá uma eficiente produção em larga escala de BDNF humano, bioactivo, a partir de sistemas de cultura de células de mamíferos. Por exemplo, pode ser possível imobilizar a endoproteinase Arg-C numa matriz sólida e estabelecer uma etapa eficiente de cromatografia em coluna.

18. EXEMPLO: O FACTOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO  
PROMOVE A SOBREVIVÊNCIA E MATURAÇÃO DE NEURÓNIOS DOPAMINÉRGICOS  
DO MESENCÉFALO VENTRAL DO RATO

18.1. MATERIAIS E MÉTODOS

18.1.1. CULTURAS DE CÉLULAS

Estabeleceram-se culturas dissociadas, por dissociação enzimática e mecânica, de tecido do mesencéfalo ventral dissecado de embriões do rato E14-E15. Tecidos misturados vindos de 2 ou 3 1 de embriões de ratos, provenientes de ratos Sprague-Dawley vivendo em conjunto, foram tripsinizados (0,125%; Worthington) em meio F12 (Gibco) durante 20 min, a 37°C. Depois de lavar em meio de crescimento (MEM contendo os seguintes suplementos: glutamina 2 mM, glucose 6 mg/ml, penicilina G 0,5 U/ml, estreptomicina 5 µg/ml, soro de vitela fetal 7,5%) o tecido foi centrifugado brevemente a baixa velocidade durante 5 min e o peletizado foi dissociado por trituração. Depois de deixar repousar 1-2 min para assentar os aglomerados de células não dispersas, a suspensão de células isoladas foi semeada em placas de 35 mm (pre-revestidas de poliornitina e laminina; Lindsay et al., 1985, Dev. Biol. 112:



:319) contendo meio de crescimento para dar uma densidade de  $5 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$ . Depois de uma noite de incubação em meio de crescimento para permitir a fixação das células, as células foram cultivadas na presença ou na ausência de BDNF num meio definido, isento de soro, como foi descrito por Bottenstein and Sato (Bottenstein and Sato, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:514), excepto na insulina que foi incluída a 20 ng/ml. Para visualizar as células dopaminérgicas fixaram-se as culturas com 4% paraformaldeído, lavaram-se intensamente, permeabilizaram-se com 0,02% Saponina em tampão de Sorensen com 1,5% soro de cavalo e marcaram-se com um anticorpo monoclonal de ratinho, contra rato TH (Boehringer-Manheim). A ligação do anticorpo foi visualizada usando um "kit" ABC Vectastain (Vector Labs).

#### 18.1.2. MEDIÇÃO DA TOMADA DE DOPAMINA

Prepararam-se culturas como se descreveu em 18.1.1., supra, e deixaram-se crescer pelo número de dias indicados, quer na presença quer na ausência de BDNF porcino a 50 ng/ml. A tomada de dopamina foi determinada em triplicado nos intervalos indicados. As células foram pre-lavadas em tampão de tomada com a seguinte composição: 136,8 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM glucose, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,1 mM ascorbato e 0,1 mM pargilina, pH 7,4. As amostras a serem medidas quanto à tomada de  $^3\text{H}$ -dopamina não neuronal tinham benzotropina incluída (BZT) no tampão de tomada, a uma concentração de 5  $\mu\text{M}$ . Depois de lavadas, as células foram pré-aquecidas a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 min em tampão fresco de tomada, altura em que se juntou  $^3\text{H}$ -dopamina (NEN, 40 Ci/mmol) até uma concentração final de 50 nM. As culturas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  durante 15 min, retirou-se a solução de tomada, colocaram-se as células sobre gelo e lavaram-se 4 vezes com tampão de tomada arrefecido a gelo. As células foram colhidas por adição de NaOH 0,5 N às placas de cultura e o extracto de NaOH foi contado num contador de cintilações Beckman com 15 ml de fluido de cintilação Ultima Gold (Packard Instruments). A tomada de dopamina neuronal específica é definida como a tomada (cpm) observada na ausência de BZT, menos a observada na presença de BZT. Na rotina, verificou-se que de 70 a



90% da tomada total era inibível pela BZT. Em culturas de réplica a cada intervalo de tempo, determinou-se o número de neurónios TH+ por marcação imunocitoquímica e os resultados indicados representam a tomada normalizada, numa base de TH+.

#### 18.1.3. EXPRESSÃO TRANSITÓRIA DO BDNF

Transfectaram-se células COS M5 com o vector CDM8 contendo a sequência codificadora do BDNF humano. 72 horas depois da transfecção, recolheram-se 50 ml do sobrenadante da cultura e dialisaram-se contra ureia 6 M. O sobrenadante dialisado foi então combinado com anfólinas (pH 3,5-1,0, BioRad) durante 4 ½ h. Recolheram-se as fracções, dialisaram-se contra tampão de  $\text{NaPO}_4$ , 25 mM, pH 7,6, usando tubagem de diálise pré-lavada em BSA (0,5 mg/ml) para evitar absorções não específicas. As fracções foram avaliadas quanto à sua actividade promotora do crescimento de neurites em culturas de explantes do gânglio da raiz dorsal do pinto E8. As fracções activas foram misturadas. A análise da mistura activa por SDS PAGE e subsequente coloração pela prata (Wray et al., 1981, Anal. Biochem. 118:197) sobre 8-18% gel, revelou uma banda esbatida a 68 kD correspondente ao BSA e uma só banda a cerca de 12 kD, correspondente à anteriormente observada para o BDNF porcino (Barde et al., 1982, EMBO J. 1:549) (resultados não indicados). Em bioavaliação comparativas realizadas sobre explantes dos gânglios da raiz dorsal, nodoso e simpático do pinto, a actividade específica e a especificidade neuronal do BDNF recombinante, purificado, humano, foram semelhantes às do BDNF porcino, purificado.

#### 18.1.4. PRODUÇÃO DE hBDNF A PARTIR DE CÉLULAS CHO TRANSFECTADAS

As células CHO-DG44 foram uma amável oferta do Dr. L. Chasin (Columbia University, NY). Estas células são deficientes em di-hidrofolato-redutase (dhfr-) (Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220). As células CHO-DG44 foram mantidas em meio F12 de Ham, com 10% soro fetal bovino, 1% penicilina e estreptomicina e 2 mM glutamina. As células foram <sup>sub</sup>cultivadas duas vezes por semana e rotineiramente examinadas quanto a contaminação micoplasmática. Todo o ADN plasmídeo foi purificado por dupla associação com cloreto de cézio antes da transfec-



ção. O gene do factor neurotrófico derivado do cérebro humano foi subclonado no vector de expressão de mamíferos pCDM8 para se obter o pC8hB como anteriormente se descreveu (Maisonpierre et al., 1990, Science 247:1446-1451). Um gene enfraquecido de di-hidrofolato-redutase, p410, foi amavelmente oferecido pelo Dr. L. Chasin. Estes dois genes construídos foram co-transfectados em células CHO-DG44 por electroporação (revista por Shigekawa and Dower, 1988, BioTechniques 6:742-751). Transfectaram-se aproximadamente  $1 \times 10^6$  células com 20  $\mu\text{g}$  de pC8hB e 0,2  $\mu\text{g}$  de p410. 48 horas após transfecção, as células CHO-DG44 foram divididas em meio de selecção constituído por F12 de Ham, isento de nucleósidos (sem timidina e hipoxantina; -HT) mais 10% de soro fetal dialisado, bovino, e 1% penicilina e estreptomicina. As colónias individuais foram isoladas aproximadamente 10 dias após colocação das células em meio de selecção isento de nucleósidos. Colónias escolhidas individualmente por serem resistentes ao crescimento em meio F12 (-HT) de Ham, isento de nucleósidos, foram tratadas com 0,02 ou com 0,05 ou com 0,1  $\mu\text{M}$  metotrexato (MTX) para induzir a amplificação dos genes (Alt et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:1357-1370). As colónias resistentes ao MTX foram cultivadas em misturas e depois amplificadas com 1,5, ou 2,0 ou 2,5  $\mu\text{M}$  MTX. Uma só colónia resistente a 2,5  $\mu\text{M}$  MTX foi isolada e escolhida para uma cultura para aumento progressivo e produção de hBDNF. A análise de mancha Southern deste clone (DGZ1000-B-3-2,5) indicou uma amplificação do gene do BDNF, em relação às células de tipo bravo CHO-DG44, de aproximadamente 50 vezes. Usaram-se bioavaliações com explantes de gânglios da raiz dorsal (DRG) do pinto embrionário (E8) para estimar que este clone produzia aproximadamente 9,5  $\mu\text{g}$  de hBDNF/ml (resultados não indicados). Produziu-se hBDNF recombinante em grande escala cultivando células DGZ1000-B-3-2,5 em garrafas rolantes, de 480  $\text{cm}^2$ . O meio foi recolhido aproximadamente 4 dias depois destas células atingirem a confluência. A purificação do hBDNF a partir do sobrenadante da cultura foi realizada como acima para o sobrenadante de COS.

### 18.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .

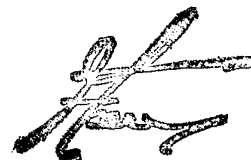
A caracterização de sinais moleculares que controlem a sobrevivência neuronal e a especificidade da inervação do alvo tem um interesse fundamental, não só porque ajuda a elucidar como é que o sistema nervoso é conformado como também porque é provável que conduza a uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na manutenção e reparação dos neurónios maduros em configurações sinápticas apropriadas. Apesar de se reconhecer amplamente que a sobrevivência e manutenção dos neurónios depende de factores neurotróficos específicos, derivados das células-alvo (Levi-Montalcini e Angeletti, 1968, *Physiol. Rev.* 48:534; Thoenen e Barde, 1980, *Physiol. Rev.*, 60:1284; Purves, D., 1988, em *Body and Brain*, Harvard University Press, Cambridge, MA.; Barde, Y.A., 1989, *Neuron*, 2:1525; Lindsay, R.M. 1988, *The Making of the Nervous System*, Oxford University Press, Oxford, p. 148) muito poucas destas moléculas têm sido completamente caracterizadas. Até ao momento, só dois factores neurotróficos, o factor de crescimento dos nervos (NGF) e o factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), têm mostrado apoiar selectivamente a sobrevivência de distintas populações neuronais in vivo (Levi-Montalcini and Angeletti, 1968, *Physiol. Rev.* 48:534; Barde, Y.A., 1989, *Neuron*, 2:1525; Leibrock et al., 1989, *Nature* 341:149).

A cultura de células neuronais tem sido amplamente usada para estabelecer bioavaliações para identificar a actividade neurotrófica nos extractos de células e de tecidos (Levi-Montalcini and Angeletti, 1968, *Physiol. Rev.* 48:534; Thoenen and Barde, 1980, *Physiol. Rev.*, 60:1284; Lindsay, R.M. 1988, *The Making of the Nervous System*, Oxford University Press, Oxford, p. 148; Varon and Adler, 1981, *Adv. Cell. Neurobiol.*, 2:118) e para determinar a especificidade neuronal dos factores neurotróficos purificados (Ebendal, T., 1989, em *Nerve Growth Factors*, John Wiley, London, p. 81; Barbin et al., 1984, *J. Neurochem.* 43:1468; Barde et al., 1982, *EMBO J.* 1:549; Davies et al., 1986, *J. Neurosci.* 6:1897; Lindsay et al., 1985, *Dev. Biol.* 112:319). Até ao momento, a maior parte dos estudos esteve concentrada nas exigências neurotróficas das diferentes classes de neurónios



do sistema nervoso periférico (SNP). A grande disponibilidade de NGF tornou-o de longe o factor neurotrófico mais bem caracterizado: o NGF tem mostrado ser essencial, tanto in vitro como in vivo, para a sobrevivência e manutenção de subpopulações neuronais quer do SNP quer do SNC (Levi-Montalcini e Angeletti, 1968, *Physiol. Rev.* 48:534; Thoenen and Barde, 1980, *Physiol. Rev.*, 60:1284; Whittemore e Seiger, 1987, *Brain Res. Rev.* 12:439; Snider e Johnson, 1989, *Ann. Neurol.* 26:489; Hefti et al., 1989, *Neurobiology of Aging* 10:515; Martinez et al., 1987, *Brain Res.* 412:295; Takei et al., 1988, *J. Neurochem.* 51:1118; Hartikka e Hefti, 1988, *J. Neurosci.* 8:2967). A maior dificuldade na identificação dos factores neurotróficos de crescimento para neurónios, específico do SNC, tem sido a reduzida disponibilidade de preparações purificadas de factores neurotróficos diferentes do NGF, e a dificuldade em obter preparações homogêneas de populações neuronais específicas. Duas observações recentes levaram-nos a estudar os efeitos do BDNF na sobrevivência de neurónios dopaminérgicos (nigrais) do SNC. Em primeiro lugar, é agora evidente que o gene do BDNF se expressa no SNC e a níveis comparáveis ou mais elevados do que o gene do NGF (Leibrock et al., 1989, *Nature* 341:149). Em segundo lugar, tem sido relatado que a proteína parcialmente purificada obtida do striatum bovino (um alvo dos neurónios dopaminérgicos nigrais), com características aparentemente semelhantes às do BDNF, pode aumentar in vitro a sobrevivência de neurónios dopaminérgicos preparados a partir do mesencéfalo (Dal Toso et al., 1988, *J. Neurosci* 8:733).

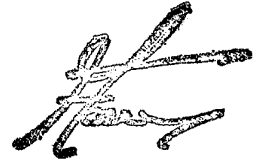
A Figura 32A ilustra o aspecto normal de células dissociadas do mesencéfalo ventral, após nove dias em cultura. Virtualmente todas as células apresentam pericária de fase brilhante e longas excrescências. Algumas células com morfologia de fibroblastos eram evidentes e não se detectaram células astrogliais quando as culturas foram marcadas com anticorpos do marcador astrogliar, a proteína acidica fibrilar glial (GFAP; Bignami et al., 1972 *Brain Res.* 43:429). Para visualizar os neurónios dopaminérgicos nesta cultura, realizou-se a marcação imunocitoquímica com anticorpos



monoclonais contra TH. Como se esperava, o número de neurónios TH+ foi pequeno (setas, Fig. 32B, 32C) e variou, dependendo do tempo de cultura, entre 0,1 e 0,5% das células na placa. Notaram-se várias morfologias neuronais entre as células TH+, como se mostra na Figura 33.

Em todas as culturas, houve invariavelmente um declínio gradual no número de células TH+ (Figs. 34A, 35) após os primeiros 3-4 dias in vitro. Aos 8 dias de cultura, p. ex., o número de células TH+ em culturas de controlo foi apenas de 25% do encontrado em culturas semelhantes no dia 2 (Fig. 35). Contudo, em culturas tratadas com BDNF, a perda de células TH+ foi muito reduzida em comparação com a dos controlos. Em todos os dias após o 8º, in vitro, o número de células TH+ em culturas tratadas com BDNF foi superior ao dos controlos não tratados, p. ex., 1,8x mais elevado, após uma única adição de BDNF (Fig. 34A) e 5x mais elevado, após múltiplas adições (Fig. 35). Mesmo quando adicionado apenas uma vez a culturas mantidas durante 8 dias, observou-se que o efeito do BDNF era dependente da dose (Fig. 34B). Em concordância com relatórios (Dal Toso et al., 1988, J. Neurosci 8:733; Knusel et al. 1990, J. Neurosci. 10:558), o NGF (50 ng/ml) não tinha qualquer efeito sobre o número de células (Fig. 34C).

Como novo processo de examinar o efeito do BDNF sobre neurónios dopaminérgicos nestas culturas, estudou-se a capacidade das células TH+ tomarem <sup>3</sup>H-dopamina. Como se indica no Quadro X, a capacidade de tomada de dopamina (normalizada por neurónios TH+) aumentou marcadamente nos primeiros 8 dias em cultura mas depois decaiu. Observou-se contudo que o BDNF não alterou a capacidade das células TH+ tomarem dopamina, pois que se obtiveram valores semelhantes no decorrer do tempo, na presença ou ausência do BDNF (Quadro X). A partir deste resultado, levantámos a hipótese de que o BDNF provavelmente actuaria directamente na promoção da sobrevivência de neurónios dopaminérgicos em culturas do mesencéfalo, em oposição à indução da expressão de um fenotipo dopaminérgico em neurónios que não exigem necessariamente BDNF para sobreviverem. Para melhor



examinar este assunto, realizámos experiências em que se determinou o número de neurónios TH+ em culturas onde a adição de BDNF foi inicialmente retardada por vários dias. Verificámos que, quando a adição de BDNF era retardada até ao dia 5 e o número de células TH+ era subsequentemente determinado nos dias 6, 8 ou 10, eram vistas nestas culturas menos células dopaminérgicas do que em culturas paralelas onde o BDNF tinha estado presente do dia 2 em diante (Fig. 36). Ainda que a adição retardada de BDNF tenha aumentado nitidamente o número de neurónios TH+ em comparação com os controlos, o efeito da adição retardada, quando examinado mesmo em alturas equivalentes (no tempo), nunca foi tal que salvasse tantos neurónios TH+ como a adição de BDNF no dia 2.

Tomados em conjunto, estes resultados atestam contra a possibilidade do BDNF actuar apenas para aumentar a expressão do gene TH num número fixo de células, e sugerem que o BDNF exerce a sua acção aumentando a sobrevivência de neurónios dopaminérgicos que de outro modo se perderiam se este factor neurotrófico não tivesse sido adicionado nas primeiras etapas do processo.

Vários relatórios têm documentado o estímulo da maturação e o melhoramento da sobrevivência in vitro de neurónios dopaminérgicos mesencefálicos quer por extractos derivados dos alvos quer por vários factores de crescimento (Dal Toso et al., 1988, J. Neurosci. 8:733; Knusel et al. 1990, J. Neurosci. 10:558; Prochiantz et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5387; DiPorzio et al., 1980, Nature 288:370; Prochiantz et al., 1981, Nature 293:570; Denis-Donini et al., 1983, J. Neurosci. 3:2292). Não houve no entanto nenhum relatório sobre uma molécula completamente purificada que directa e selectivamente apoiasse a sobrevivência de neurónios TH+ na ausência completa de células gliais ou de células melhoradas por divisão (como se observa, p. ex., com IgF-1 ou FGF, Dal Toso et al., 1988, J. Neurosci 8:733). Em concordância com relatórios anteriores que usaram tecido de ratinho das primeiras fases embrionárias (Dal Toso et al., 1988, J. Neurosci 8:733), verificou-se que células do mesencéfalo ventral do rato E14 em meio definido, sem soro, eram essencialmente isentas de astrócitos ou fibroblastos. A densidade



relativamente baixa de células colocadas em placa, 50 000 células/cm<sup>2</sup>, usada neste estudo diminuiu os efeitos de qualquer actividade neurotrófica endógena possível e permitiu uma contagem de células mais precisa. Em vista dos resultados aqui apresentados, mostra-se que o factor neurotrófico, parcialmente purificado a partir de striatum bovino por Del Toso et al. (Dal Toso et al., 1988, J. Neurosci 8:733), é provavelmente o BDNF. Isto sugere que o BDNF é produzido no striatum e levado pelos terminais dos neurónios dopaminérgicos que se projectam da substância negra. Até agora, contudo, o ARNm do BDNF (ou mesmo o ARNm de outros membros da família da neurotrofina) ainda não foi observado como existindo em abundância no tecido do striatum por análise de mancha Northern.

É evidente que a adição do BDNF, mesmo no caso de adições múltiplas, não tem como resultado a sobrevivência completa de neurónios dopaminérgicos nigrais durante os períodos de cultura analisados. Este fenómeno já tinha sido observado, em condições experimentais muito semelhantes às nossas, por Dal Toso et al. (Dal Toso et al., 1988, J. Neurosci 8:733) que mostrou que esta perda poderia estar relacionada com a densidade de células usada; a densidades de células mais elevadas (4 vezes as aqui usadas) poderia ver-se um maior número de células fluorescentes à catecolamina e o desaparecimento espontâneo destas células seria diminuído. O contacto célula-célula é possivelmente necessário para a sobrevivência, a longo termo, destas células.

Serão necessários novos estudos, particularmente os dirigidos ao exame dos efeitos do BDNF sobre o desenvolvimento e manutenção de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo ventral in vivo, para determinar a relevância fisiológica dos efeitos do BDNF aqui descritos. Em face da perda específica de neurónios dopaminérgicos nigrais na doença de Parkinson, é particularmente desejável obter um factor neurotrófico que afecte selectivamente estas células. Assim, a presente descoberta de que o BDNF apoia a sobrevivência destes neurónios, células que são refractárias ao NGF, fornece fundamento lógico para experiências em animais, que determinarão se o BDNF pode proteger os neurónios dopaminérgicos

dos efeitos neurotóxicos quer da 6-hidroxidopamina ou do MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina). estes estudos podem conduzir a uma abordagem terapêutica do Parkinsonismo.

---

QUADRO X

A TOMADA DE DOPAMINA EM CULTURAS DO MESENCÉFALO VENTRAL  
NÃO É DIRECTAMENTE AUMENTADA PELO BDNF

| <u>Dias de Cultura</u> | <u>Tomada de <math>^3\text{H}</math>-dopamina</u><br><u>(cpm/TH/(+) neurónio/15 minutos)</u> |                           |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
|                        | <u>Controlo</u>                                                                              | <u>Tratadas pelo BDNF</u> |
| 3                      | 0,51 $\pm$ 0,1                                                                               | 0,95 $\pm$ 0,2            |
| 6                      | 4,5 $\pm$ 0,3                                                                                | 3,1 $\pm$ 0,6             |
| 8                      | 18,5 $\pm$ 5,3                                                                               | 27,3 $\pm$ 1,2            |
| 10                     | 3,37 $\pm$ 0,24                                                                              | 2,21 $\pm$ 0,18           |

---

19. EXEMPLO: O BDNF PRODUZ UMA INIBIÇÃO, DEPENDENTE  
DA DOSE, DA TOMADA DO ÁCIDO GAMA-AMINO BUTÍRICO

19.1. MATERIAIS E MÉTODOS

19.1.1. CULTURAS DE CÉLULAS DO HIPOCAMPO

Os hipocampos de embriões E18-19 de ratos Sprague-Dawley foram dissecados e recolhidos em meio F10. Os tecidos foram cortados, lavados por 2x com meio F10 (Gibco) e tripsinizados com 0,25% tripsina (Gibco) durante 20 min., a 37°C. A tripsina foi inactivada pela adição de um meio contendo soro, composto de meio essencial mínimo (MEM) suplementado com soro fetal, de vitela, (FCS, 10%), glutamina (2 mM), penicilina (25 U/ml) e estreptomicina (25 µg/ml). Células dissociadas, obtidas por trituração suave, foram recolhidas e centrifugadas a baixa velocidade (500 rpm) durante 30 s. A centrifugação foi repetida 2x e os peletizados de células foram então ressuspensos em meio contendo soro. As células foram depois colocadas em placas, em poços de 6 mm ou em placas de 35 mm que tinham sido revestidas com poliornitina (10 µg/ml) e laminina (10 µg/ml). Na maior parte das experiências, as células foram colocadas em placa a uma densidade baixa, de aproximadamente 71 000 células/cm<sup>2</sup>. Cinco a seis horas após a colocação de células em placa, o meio foi mudado para um

meio livre de soro contendo 1% N3 e penicilina-estreptomicina (25 unidades/ml e 25 µg/ml, respectivamente), altura em que se adicionou o BDNF. O meio foi mudado em cada 3 a 4 dias, com re-adição do factor.

#### 19.1.2. MEDIDA DA TOMADA, POR ALTA AFINIDADE, DO ACIDO GAMA-AMINOBUTÍRICO (GABA)

A tomada de GABA por alta afinidade foi medida usando um processo modificado de Tomozawa and Appel (1986, Brain Res. 399:111-124). As células foram lavadas em tampão de tomada de GABA, contendo 140 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 mg/ml glucose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% BSA. Depois de lavadas, as células foram incubadas com o tampão de tomada de GABA durante 5 min a 37°C. Juntou-se então <sup>3</sup>H-GABA (NEN, NET-191X, 111,4 Ci/mmol) a uma concentração final de 12 nM e realizou-se uma incubação a 37°C, durante 10 min. As células foram depois mantidas em gelo e lavadas 3x com tampão de tomada. Incubaram-se as células com NaOH 0,14 N durante 2 h à temperatura ambiente e procedeu-se à contagem de <sup>3</sup>H-GABA no extracto. Verificou-se que a tomada de <sup>3</sup>H-GABA era linear até pelo menos 30 min. A tomada de GABA por células não neuronais foi inibida pela adição de 2 mM β-alanina, enquanto que a tomada especifica pelos neurónios se verifica por inibição com o ácido nipecópico a 1 mM.

#### 19.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detectámos recentemente níveis abundantes de mensagem do BDNF em culturas do hipocampo enriquecidas com neurónios mas não em astrócitos do hipocampo. Estes resultados sugerem fortemente que o BDNF está localizado nos neurónios do hipocampo. A fim de examinar o efeito do BDNF nos neurónios do hipocampo, em cultura, trataram-se células com várias concentrações de BDNF (purificado por "rotorpor" a partir de sobrenadantes de COS). No fim dum período de 8 dias de tratamento, mediu-se a tomada por alta afinidade de GABA pelos neurónios. Como se mostra na Figura 37, o BDNF produziu uma inibição, dependente da dose, da tomada de GABA. Assim, o BDNF pode afectar a sobrevivência e/ou a expressão fenotípica dos neurónios GABAérgicos. O BDNF não teve qualquer efeito sobre neurónios contendo glutamato (verificado por medi-

ções da tomada de glutamato) nem sobre os níveis da proteína dos neurofilamentos. Assim, o efeito do BDNF sobre culturas de hipocampo mostra ser específico para os neurónios GABAérgicos.

20. EXEMPLO: O BDNF CONFERE UM EFEITO PROTECTOR CONTRA OS EFEITOS TÓXICOS DO MPP+

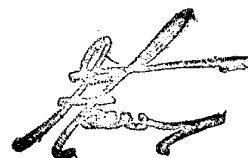
20.1. MATERIAIS E MÉTODOS

20.1.1. MEDIDA DOS EFEITOS DOS FACTORES NEUOTRÓFICOS SOBRE CÉLULAS SH-SY5Y TRATADAS COM MPP+

Semearam-se células SH-SY5Y em placas de 24 poços a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço. Vinte e quatro horas após a sementeira, trataram-se as células com factores neurotróficos. Vinte e quatro horas após o tratamento com factores neurotróficos, trataram-se as células com MPP+ (10  $\mu$ M). Quarenta e oito horas após a adição de MPP+, quantificou-se o número de células viáveis pelo ensaio de exclusão pelo azul de tripano. Os factores neurotróficos utilizados foram mNGF-COS (diluição 1:5), hBDNF-COS (diluição 1:5), nCNTF purificado a partir de E. coli (25 ng/ml), bFGF purificado, de cérebro bovino (25 ng/ml), rNT3-COS (diluição 1:5) e hEGF purificado (25 ng/ml).

20.1.2. MEDIDA DOS EFEITOS DOS FACTORES NEUOTRÓFICOS SOBRE CULTURAS DE MESENCÉFALO VENTRAL TRATADAS COM MPP+

Estabeleceram-se culturas de neurónios do mesencéfalo ventral, dissociados, a partir de embriões E14 de rato de acordo com os protocolos referidos (Ver Secção 18, supra). 48 h depois do estabelecimento destas culturas, estas foram tratadas com os agentes neurotróficos apropriados como se indicou. Os factores neurotróficos incluíram hBDNF (purificado em "rotaphor" a partir de células CHO,  $\leq 50$  ng/ml) mNGF purificado (50 ng/ml) rNT-3 (de sobrenadantes de COS, a uma diluição de 1:50), bFGF, purificado, de cérebro bovino (10 ng/ml) e rCNTF purificado (25 ng/ml) (de E. coli). Vinte e quatro horas após a adição do factor neurotrófico, trataram-se as culturas com MPP+ (1  $\mu$ M). Quarenta e oito horas após o tratamento com MPP+, identificaram-se, por imuno-histoquímica, e quantificaram-se os neurónios positivos à TH. Os resultados representam a média de três experiências independentes realizadas com amostras em triplicado por cada experiência. O



número de neurónios positivos a seguir ao tratamento pelo MPP+ está representado por barras a tracejado. As barras a claro representam o número de neurónios positivos à TH sem tratamento com MPP+.

## 20.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando o BDNF, NGF, CNTF, NT-3, bFGF e EGF foram ensaiados, separadamente, quanto à sua capacidade de protegerem células SH-SY5Y da toxicidade do 1-metil-4-fenil-piridínio (MPP+), através do ensaio de exclusão pelo azul de tripano, somente o BDNF e o NGF mostraram uma actividade significativamente protectora contra a toxicidade do MPP+ (Quadros XI e XII).

---

QUADRO XI  
PROTECÇÃO, PELO BDNF E NGF, DE CÉLULAS SH-SY5Y CONTRA  
A TOXICIDADE DO MPP+

| <u>Resultados:</u>                    | <u>Nº. de Células Viáveis</u> |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| <u>Tratamento:</u>                    | <u>(% de viáveis)</u>         |
| COS-transfectados por simulação (1:5) | $0,4 \times 10^4$ (5%)        |
| BDNF-COS (1:5)                        | $1,2 \times 10^5$ (67%)       |
| NGF-COS (1:5)                         | $1,7 \times 10^5$ (84%)       |
| CNTF                                  | $0,6 \times 10^4$ (14%)       |
| NT-3                                  | $0,7 \times 10^4$ (20%)       |
| bFGF                                  | $0,4 \times 10^4$ (11%)       |
| EGF                                   | $0,1 \times 10^4$ (3%)        |

---



---

QUADRO XII  
CURVA DE CONCENTRAÇÕES DE BDNF E NGF NAS EXPERIÊNCIAS  
DE TOXICIDADE PELO MPP+

| <u>Tratamento</u> | <u>% de Células Viáveis</u> |
|-------------------|-----------------------------|
| COS-MOCK (1:2)    | 13                          |
| (1:5)             | 5                           |
| (1:10)            | 3                           |
| (1:20)            | 6                           |
| (1:50)            | 7                           |
| (1:100)           | 2                           |
| COS-BDNF (1:2)    | 73                          |
| (1:5)             | 67                          |
| (1:10)            | 65                          |
| (1:20)            | 42                          |
| (1:50)            | 30                          |
| (1:100)           | 25                          |
| COS-NGF (1:2)     | 88                          |
| (1:5)             | 84                          |
| (1:10)            | 63                          |
| (1:20)            | 50                          |
| (1:50)            | 47                          |
| (1:100)           | 34                          |

---

Nas culturas do mesencéfalo ventral, os resultados indicam que o BDNF mostra um efeito protector significativo contra a toxicidade pelo MPP+, enquanto que o bFGF exerce um efeito menor (Figura 38). Verificou-se que o tratamento pelo MPP+ reduz o número de neurónios positivos à tirosina-hidroxilase em 85% em culturas de controlo mas apenas em 40% em culturas pre-tratadas com BDNF, antes da exposição ao MPP+. O MPP+ é o suposto metabolito activo da toxina MPTP que se tem observado induzir um síndrome semelhante à doença de Parkinson, que é um sistema modelo aceite da doença de Parkinson. Assim, o efeito protector do BDNF e NT-3 indicam que estes compostos podem provar ser úteis



no tratamento da doença de Parkinson ou para evitar danos neurológicos que se sigam à exposição tóxica.

#### 21. DEPÓSITO DE MICRORGANISMOS

Os seguintes ADN, plasmídeo, recombinante e bacteriofago recombinante, foram depositados em 30 de Agosto de 1989 na American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852:

| <u>Nº. de Acesso</u> | <u>ATCC</u> |
|----------------------|-------------|
| phBDNF-C-1           | 40648       |
| λhBDNF-G-1           | 40649       |

O presente invento não se encontra limitado, no seu âmbito, pelos arranjos específicos aqui descritos. De facto, várias modificações do invento além daquelas aqui descritas serão evidentes para os peritos na arte a partir da exposição precedente e desenhos em anexo. Pretende-se que estas modificações estejam dentro do âmbito das reivindicações em anexo.

Várias publicações são aqui citadas, sendo as suas revelações aqui incorporadas apenas para referência do seu conteúdo.



# REIVINDICAÇÕES

1 - Processo de preparação de uma molécula de ADN recombinante, caracterizado por a molécula compreender uma sequência de ácidos nucleicos codificando factor neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) ou uma sua subsequência compreendendo cerca de, pelo menos 10 nucleótidos.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o factor neurotrófico derivado de cérebro codificando a sequência ou subsequência de ácido nucleico ser essencialmente a que se apresenta seguidamente

|                                                                                 |      |
|---------------------------------------------------------------------------------|------|
| AAACCGGG                                                                        | 3    |
| CACCAAGATTCCCCCTACCCCTTCCTTTTGACCAAGGGAACGTGAAAAATAATAGAGTCTGGGGATTTCGGGGCC     | 84   |
| GAAGTCTTCCCCAGAGCAGCTGCCCTGATGTTACTTTGACAAGTAGTGACTGAAAAGTTCACCAGGTGAGAAGAGTG   | 165  |
| 1                                                                               | 20   |
| Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met Lys Ala Ala Pro |      |
| ATG ACC ATC CTT TTC CTT ACT ATG GTT ATT TCA TAC TTC GGT TGC ATG AAG GCT GCC CCC | 225  |
| 30                                                                              | 40   |
| Met Lys Glu Ala Asn Val Arg Gly Gln Gly Ser Leu Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His |      |
| ATG AAA GAA GCC AAC GTC CGA GGA CAA GGC AGC TTG GCC TAC CCA GGT GTG CGG ACC CAT | 286  |
| 50                                                                              | 60   |
| Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Ser Ser |      |
| GGG ACT CTG GAG AGC GTG AAT CGG CCC AAG GCA GGT TCA AGA GGC CTG ACA TCG TCG TCA | 346  |
| 70                                                                              | 80   |
| Ser Ser Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln |      |
| TCG TCG TCG TTG GCG GAC ACT TTT GAA CAC GTG ATC GAG GAG CTG TTG GAC GAG GAC CAG | 406  |
| 90                                                                              | 90   |
| Lys Val Arg Pro Asn Glu Glu Asn Asn Lys Asp Ala Asp Met Tyr Thr Ser Arg Val Met |      |
| AAA GTT CGG CCC AAT GAG GAA AAC AAT AAG GAC GCG GAC ATG TAT ACG TCC CGA GTC ATG | 466  |
| 110                                                                             | 120  |
| Leu Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu Tyr Lys Asn |      |
| CTC AGC AGT CAA GTG CCT TTG GAG CCT CCT CTT CTC TTT CTG CTG GAG GAA TAC AAA AAT | 526  |
| 130                                                                             | 140  |
| Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg His Ser Asp Pro Ala Arg Arg |      |
| TAC CTG GAT GCT GCA AAC ATG TCC ATG AGG GTC CGG CGC CAC TCG GAC CCC GCC GGC CGC | 586  |
| 150                                                                             | 160  |
| Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr |      |
| GGG GAG CTG AGC GTG TGC GAC AGC ATT AGC GAG TGG GTG ACG GCG GCG GAT AAA AAG ACG | 646  |
| 170                                                                             | 180  |
| Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly |      |
| GCA GTG GAC ATG TCG GGT GGC ACG GTC ACG GTC CTC GAA AAA GTC CCC GTC TCG AAA GGC | 706  |
| 190                                                                             | 200  |
| Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Gly Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly |      |
| CAA CTG AAG CAG TAC TTC TAC GAG ACC AAG TGC AAT CCT ATG GGG TAC ACA AAG GAG GGC | 766  |
| 210                                                                             | 220  |
| Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val |      |
| TGC AGG GGC ATA GAC AAG AGC CAC TGG AAC TCC CAG TGC CGA ACT ACC CAG TCG TAT GTG | 826  |
| 230                                                                             | 240  |
| Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr |      |
| CGG GCC CTC ACC ATG GAT AGC AAA AAA CGA ATT GGC TGG CGG TTC ATA AGG ATA GAC ACT | 886  |
| 250                                                                             |      |
| Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg End                             |      |
| TCC TGT GTA TGT ACT TTG ACC ATT AAG AGG GGA AGA TAG TGGCTTTATGTTGTATAGATTATATG  | 954  |
| ACACAAAAATTATCTATTTGTATATATACATAACAGGGTAATTATTTCAGTTAAGAAAAAAATAATTTTATGAACTC   | 1035 |
| ATGTATAAATGAAGTTTATACAGTACAGTGGTTCTACAATCTATTTATTGGACATTTCCATGACCAGAGGGAAACAGTC | 1115 |
| ATTTTTTGGCACAACCTTTAAAAAAAAGTCTGCATTACATTCCTCGATAATGTTGTGGTTTGTGCGCGTTGCT       | 1184 |

desde cerca do nucleótido 167 a cerca do nucleótido 927.



3 - Processo de obtenção de uma sequência de ácidos nucleicos, caracterizado por a sequência compreender uma sequência codificando uma proteína essencialmente homóloga à sequência de aminoácidos apresentada na reivindicação 2, ou a suas porções.

4 - Processo de obtenção de um vector de ácido nucleico, caracterizado por o vector compreender a molécula de ADN da reivindicação 1.

5 - Processo de obtenção de um microrganismo recombinante, caracterizado por o microrganismo conter a molécula de ADN da reivindicação 1.

6 - Processo de obtenção de uma célula, caracterizado por a célula conter a molécula de ADN recombinante da reivindicação 1.

7 - Processo para a produção de proteína BDNF ou de um seu fragmento, caracterizado por se fazer crescer um microrganismo recombinante, contendo a molécula da reivindicação 1, de tal modo que a molécula de ADN seja expressa pelo microrganismo; e isolar a proteína BDNF ou o seu fragmento expressos.

8 - Processo para a produção de proteína BDNF ou um seu fragmento, caracterizado por se fazer crescer um microrganismo recombinante, contendo a molécula da reivindicação 2, de tal modo que a molécula seja expressa pelo microrganismo; e isolar a proteína BDNF ou o fragmento expressos.

9 - Processo de obtenção de um anticorpo, fragmento de anticorpo ou seu derivado, caracterizado por reconhecerem uma proteína, fragmento peptídico ou derivado de BDNF.

10 - Processo de isolamento de uma molécula de ADN recombinante que codifica uma proteína ou péptido que compreende uma primeira sequência de aminoácidos, homóloga à de dois diferentes membros conhecidos da família de genes BDNF/NGF, e uma segunda sequência de aminoácidos que não é homóloga nem a BDNF nem a NGF, caracterizado por compreender:

(a) seleccionar, de entre uma diversidade de sequências de



ácidos nucleicos, as sequências que são homólogas tanto a BDNF como a NGF; e

(b) identificar, de entre as sequências de ácidos nucleicos seleccionadas em (a), as sequências que contêm, aproximadamente, pelo menos, 6 nucleótidos contíguos que não são homólogos aos de NGF nem aos de BDNF.

11 - Processo de preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado por se associar uma quantidade eficaz de uma proteína de BDNF essencialmente pura com um portador farmacêuticamente adequado.

12 - Processo para diagnóstico de uma doença ou desordem do sistema nervoso, caracterizado por compreender:

(a) fazer contactar um tecido com uma molécula de ácido nucleico, marcada de maneira a ser detectável, a qual contém, pelo menos, dez nucleótidos sob condições que permitam a ocorrência da hibridação; e

(b) detectar qualquer hibridação que tenha ocorrido.

13 - Processo para isolar um gene membro da família de genes do factor neurotrófico derivado de cérebro/factor de crescimento de nervo (NGF), mas que não codifica nem o factor de crescimento de nervo nem o factor neurotrófico derivado de cérebro, caracterizado por compreender:

(a) seleccionar, de entre uma diversidade de sequências de ácidos nucleicos, as sequências que são homólogas tanto a BDNF como a NGF;

(b) identificar, de entre as sequências de ácidos nucleicos seleccionadas em (a), as sequências que contêm sequências de cerca de, pelo menos, 6 nucleótidos contíguos que não são homólogos aos de NGF e BDNF; e

(c) isolar as sequências identificadas em (b).

14 - Processo para aumentar os níveis de BDNF expresso em células do sistema nervoso, caracterizado por compreender expor

71 493

6526-019-118

-140-

as células do sistema nervoso a ácido cainico ou a um composto afim.

15 - Processo para aumentar os níveis de NGF expressa em células do sistema nervoso, caracterizado por compreender expor as células do sistema nervoso a ácido cainico ou a um composto afim.

16 - Processo de preparação de BDNF activo a partir de uma molécula precursora menos activa, caracterizado por compreender expor a célula a uma quantidade eficaz de endoproteinase Arg-C.

Lisboa,

30. AGO. 1990

Por MAX PLANCK INSTITUT FUR PSYCHIATRIE e  
REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

- O AGENTE OFICIAL -

● ADJUNTO

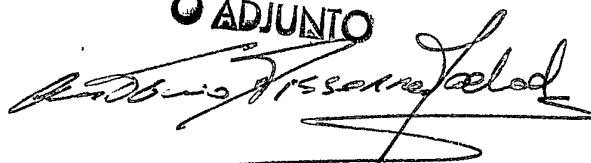




FIG. 1

AAACCGGG 8

CACCAAAGATTCCCCCTACCCCTTCTTTTGACCAAAGGGAACGTGAAAAATAATAGAGTCTGGGGATTTCGGGGCC 84

GAAGTCTTCCCAGAGCAGCTGCCTTGATGTTTACTTTGACAAGTAGTGACTGAAAAGTTCCACCAGGTGAGAAGAGTG 166

1 10 20

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met Lys Ala Ala Pro  
ATG ACC ATC CTT TTC CTT ACT ATG GTT ATT TCA TAC TTC GGT TGC ATG AAG GCT GCC CCC 226

30 40

Met Lys Glu Ala Asn Val Arg Gly Gln Gly Ser Leu Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His  
ATG AAA GAA GCC AAC GTC CGA GGA CAA GGC AGC TTG GCC TAC CCA GGT GTG CGG ACC CAT 286

50 60

Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Ser Ser  
GGG ACT CTG GAG AGC GTG AAT GGG CCC AAG GCA GGT TCA AGA GGC CTG ACA TCG TCG TCA 346

70 80

Ser Ser Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln  
TCG TCG TCG TTG GCG GAC ACT TTT GAA CAC GTG ATC GAG GAG CTG TTG GAC GAG GAC CAG 406

90 90

Lys Val Arg Pro Asn Glu Glu Asn Asn Lys Asp Ala Asp Met Tyr Thr Ser Arg Val Met  
AAA GTT CGG CCC AAT GAG GAA AAC AAT AAG GAC GCG GAC ATG TAT ACG TCC CGA GTC ATG 466

110 120

Leu Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu Tyr Lys Asn  
CTC AGC AGT CAA GTG CCT TTG GAG CCT CCT CTT CTC TTT CTG CTG GAG GAA TAC AAA AAT 526

130 140

Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg His Ser Asp Pro Ala Arg Arg  
TAC CTG GAT GCT GCA AAC ATG TCC ATG AGG GTC CGG CGC CAC TCG GAC CCC GCC CGC CGC 586

150 160

Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr  
GGG GAG CTG AGC GTG TGC GAC AGC ATT AGC GAG TGG GTG ACG GCG GCG GAT AAA AAG ACG 646

170 180

Ala Val Asp Met Ser Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly  
GCA GTG GAC ATG TCG GGT GGC ACG GTC ACG GTC CTC GAA AAA GTC CCC GTC TCG AAA GGC 706

190 200

Gln Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu Gly  
CAA CTG AAG CAG TAC TTC TAC GAG ACC AAG TGC AAT CCT ATG GGG TAC ACA AAG GAG GGC 766

210 220



## FIG. 1 (cont.)

Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val  
 TGC AGG GGC ATA GAC AAG AGG CAC TGG AAC TCC CAG TGC CGA ACT ACC CAG TCG TAT GTG 826  
 230 240  
 Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr  
 CGG GCC CTC ACC ATG GAT AGC AAA AAA CGA ATT GGC TGG CGG TTC ATA AGG ATA GAC ACT 886  
 250  
 Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg  
 TCC TGT GTA TGT ACT TTG ACC ATT AAG AGG GGA AGA TAG TGGCTTTATGTTGTATAGATTATATTG 952  
 AGACAAAAATTATCTATTTGTATATATACATAACAGGGTAAATTATTCAGTTAAGAAAAAATAATTTTATGAACTGC 1031  
 ATGTATAAATGAAGTTTATACAGTACAGTGGTTCTACAATCTATTTATTGGACATTTCCATGACCAGAGGGAAACAGTC 1110  
 ATTTTTTGCGCACAACTTTAAAAAAAAGTCTGCATTACATTCCTCGATAATGTTGTGGTTTGTTCGGTTGCT 1184

## FIG. 2

HSDPARRGELSVCDISEWVTAADKKTAVDMSGGTVTVLEKVPVSKGQLKQYFYETKCNP  
 SSSHPVFHHRGEFSVCDISVSVWV. .GDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKCRD  
 SSSHPVFHHRGEFSVCDISVSVWV. .GDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKCRD  
 SSTHPVFHMGEFSVCDISVSVWV. .ADKTTATDIKGKEVTVLAENVNINNSVFKQYFFETKCRD  
 SSTHPVFHMGEFSVCDISVSVWV. .GDKTTATDIKGKEVTVLAENVNINNSVFKQYFFETKCRD  
 TAHPLVLRGEFSVCDISVSMWV. .GDKTTATDIKGKEVTVLAENVNINNSVFKQYFFETKCRD  
 EDHPVHNLGEHSVCDISVSAWV. .TKTTATDIKGNTVTVMENVNLNKKVYKQYFFETKCKN

BDNF de porco  
 NGF humano  
 NGF de bovino  
 NGF de porcos  
 NGF de ratinho  
 NGF de pinto  
 NGF de cobra

MGYTKEGCRGIDKRHWNSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGWRFIRIDTSCVCILTIKGR  
 PNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTHTFVKALTMGKQ. AAWRFIRIDTACVCVLSRKAVRRA  
 PNPVDSGCRGIDAKHWNSYCTTHTFVKALTMGKQ. AAWRFIRIDTACVCVLSRKATGQRA  
 PSPVESGCRGIDSKHWNSYCTTHTFVKALTTDNKQ. AAWRFIRIDTACVCVLSRKAAARRG  
 SNPVESGCRGIDSKHWNSYCTTHTFVKALTTDEKQ. AAWRFIRIDTACVCVLSRKATRRG  
 PRPVSSGCRGIDAKHWNSYCTTHTFVKALTMCGKQ. AAWRFIRIDTACVCVLSRKSGRP  
 PNPEPSGCRGIDSSHWSYCTETDTFVKALTMENQ. ASWRFIRIETACVCVITKKKGN

BDNF de porco  
 NGF humano  
 NGF de bovino  
 NGF de porcos  
 NGF de ratinho  
 NGF de pinto  
 NGF de cobra

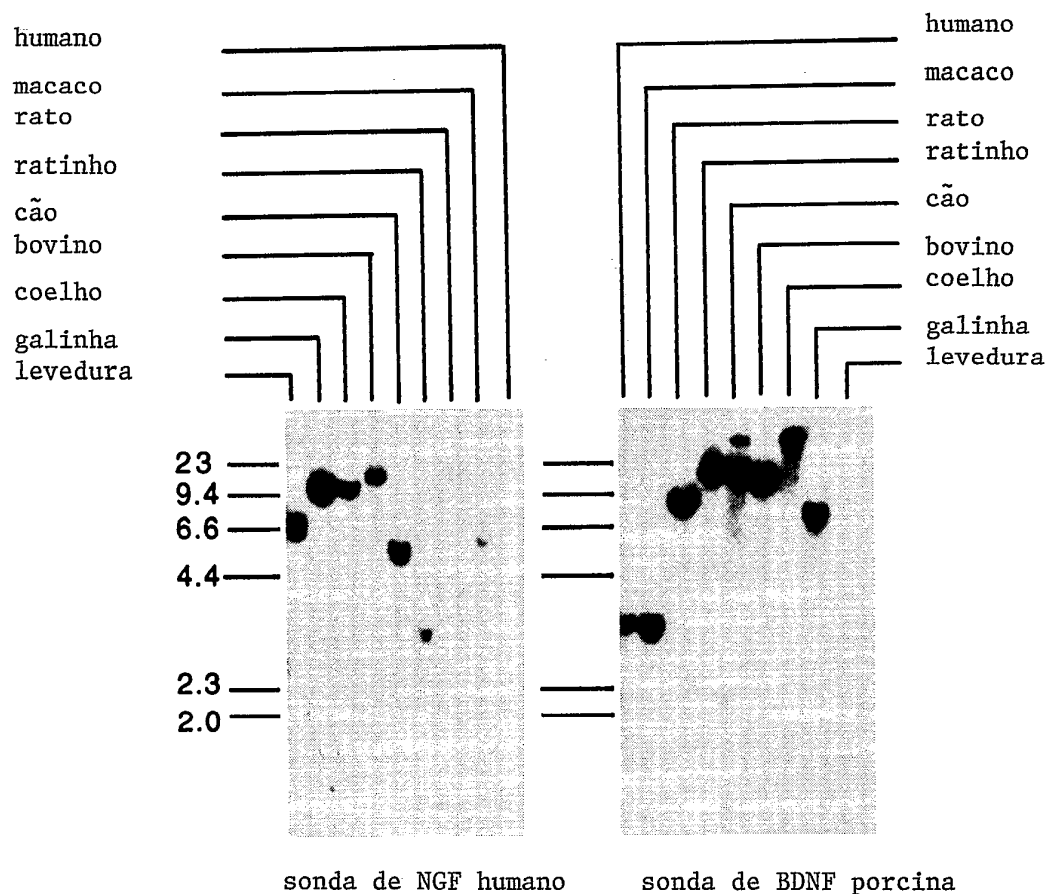


**FIG. 3**

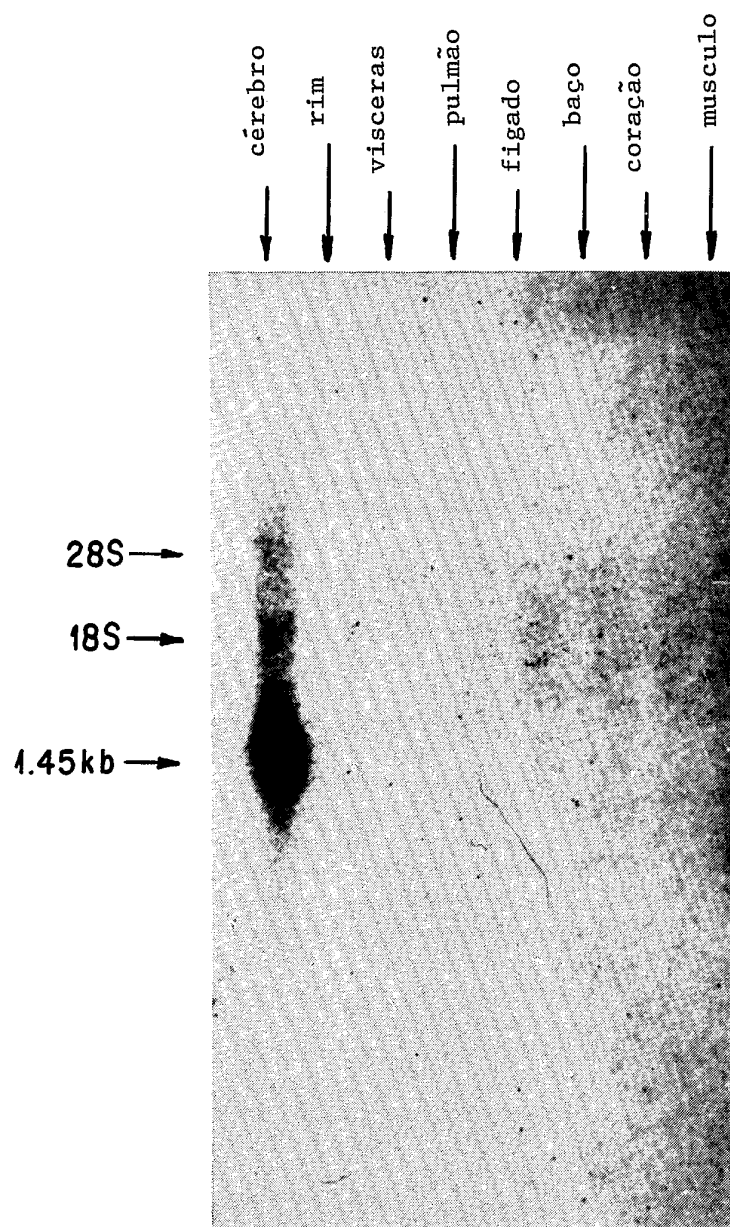


FIG. 4

*Handwritten signature*

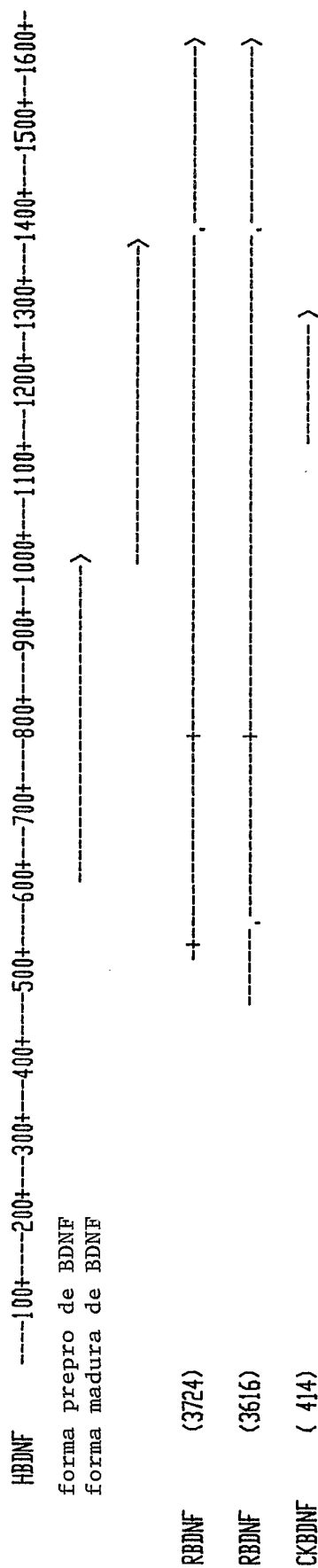


FIG. 5

## FIG. 5 (cont.)

|        | 10                                                                                                                                           | 20  | 30  | 40  | 50  | 60  | 70  | 80  | 90  | 100 | 110 | 120 |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| humano | AAGCTTGATATCGAATCCGGAAATCCGGTCCCAACTGCTGTTTATTGTGCTATTTCAGCTAGACATCAGATAGCAAGGCCCATCAGACCCCTCAGGCCACTGCTGTTCCCTGTCACACATTC                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | TTCGAACATATAGCTTAAGGCCCTTAAGGCCCTTAAGGCCCAAGGGGTTGACGACAAATAACACGATAAGTACGGATCTGTAGTGATCGATCTTCCGGGTAGTCTGGGGAGTCCGGTGACGACAAAGGACAGTGTGTAAG |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 130    | 140                                                                                                                                          | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 |
| humano | CTGCAAGGACCATGTTGCTAACTTGAAAAAATTACTATTAAATTACACTTCAGTGTGCTTAGTAACATTTATGATTTTGTGTTCTCGTGACAGCATGAGCAGAGATCATTAANAATTAAACTTA                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | GACGTTTCCCTGGTACACGATTGAACTTTTTAAATGATAATTAAATGTGAAGCTCAACAGGAATCATTTGTAAATACATAAACAACAAAGAGCAGCTGCTGCTCTAGTAAATTTTAAATTTGAAT                |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 260    | 270                                                                                                                                          | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 |
| humano | CAAAGCTGCTAAAGTGGGAAGAGGAGAACTTGAAGCCACAATTTTGCACCTTGGTTAGAACCCATCTAATCTCAGGTTATATGCTAGATCTTGGGGGCAAAACACTGCTGCTGTTATATTA                    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | GGTTCGACGATTTACCCCTTCTTCCCTTGAACCTTCGGGTAAACGCTGAACGAATCTTCGGTAGATTAGAGTCCCAATATACGATCTAGAACCCCGTTTGTGACGTACAGAGACCAATATATAATTT              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| HBINF  |                                                                                                                                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 390    | 400                                                                                                                                          | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 |
| humano | CCACATACAGCACACTACTGACACTGATTGTTGTCGGTGGAGTTTATCACCAGACATAAAAAACCTTGACCCCTGCAGAAATGGCCTGGAAATACAAATCAGATGGGCCACATGGCATCCCGG                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|        | GGTGATGTCGTGTGATGACTGTGACTAAACACAGACACAGCAGCTCGACCTCAAAATAGTGGTCTGTGATTTTGTGGAACTGGGACGCTTACCGGACCTTAAATGTTAGTCTACCCGGGTACCGTAGGGCC          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

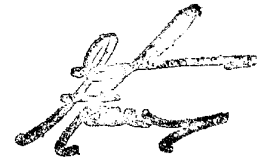
C

rato 4  
porco 39

...CA...GGG...G.G..AAATA.T.GA.T.TG..G....-...-G.A.T.T.....-C>  
...A...T....>

|        | 520                                                         | 530                                                       | 540      | 550        | 560      | 570      | 580      | 590      | 600      | 610      | 620      | 630      |
|--------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|        | HBDNF                                                       |                                                           |          |            |          |          |          |          |          |          |          |          |
| humano | TGAAGAAAGCC                                                 | TAAACAGTT                                                 | TTTCTGCT | TTGTTCTGCT | TTTCTGCT | TTTCTGCT | TTTCTGCT | TTTCTGCT | TTTCTGCT | TTTCTGCT | TTTCTGCT | TTTCTGCT |
|        | ACTTCTTTCGG                                                 | GATTGGTCAA                                                | AAAGACAG | ACAAAGAC   | AAAGAC   | AAAGAC   | AAAGAC   | AAAGAC   | AAAGAC   | AAAGAC   | AAAGAC   | AAAGAC   |
|        | Met Thr Ile                                                 | Leu Phe                                                   | Leu Thr  | Met Val    | Ile Ser  | Tyr Phe  | Gly>     |          |          |          |          |          |
|        | 0                                                           | 0                                                         | 0        | 0          | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        | 0        |
| ratio  | 17 CCTTG..C..AG..-C.G.G.A...G..-C.GA.G.GG.-AG.A..T.A.C..... | 99 A..GCAGCT...T.G.--T...A...-..GACAAG.AG.GA..-AAA.A..... |          |            |          |          |          |          |          |          |          |          |

FIG. 5(cont.)



|        | -HBDNF-                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|        | 640                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 650 | 660 | 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 |     |  |
| humano | TGC ATG AAG GCT GCC CCC ATG AAA GAA GCA AAC ATC CGA GGA CAA GGT GGC TTG GCC TAC CCA GGT GTG CGG ACC CAT GGG ACT CTG GAG AGC GTG<br>ACG TAC TTC CGA CGG GGG TAC TTT CTT CGT TTG TAG GCT CCT GTT CCA CCG AAC CGG ATG GGT CCA CAC GCC TGG GTA CCC TGA GAC CTC TCG CAC<br>Cys Met Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| rato   | 129                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |  |
| porco  | 209                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |  |
|        | 730                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 | 790 | 800 | 810 | 820 |  |
| humano | AAT GGG CCC AAG GCA GGT TCA AGA GGC TTG ACA TCA TTG GCT GAC ACT TTC GAA CAC GTG ATA GAA GAG CTG TTG GAT GAG GAC CAG AAA GTT CGG<br>TTA CCC GGG TTC CGT CCA AGT TCT CCG AAC TGT AGT AAC CGA CTG TGA AAG CTT GTG CAC TAT CTT CTC GAC AAC CTA CTC CTG GTC TTT CAA GCC<br>Asn Gly Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Asp Gln Lys Val Arg |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| rato   | 225                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |  |
| porco  | 305                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |  |

FIG. 5(cont.)

**FIG. 5 (cont.)**

[illegible]

```

...C...C.A...T...C.T...G.G.A...G...
608 .C...C...G...G...T...C...G...C.C.G...
porco

```

MAX PLANCK INSTITUT FUR PSYCHIATRIE e REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

**FIG. 5(cont.)**

[illegible]

|       |     |         |       |
|-------|-----|---------|-------|
| rato  | 807 | C.      | ..... |
| porco | 896 | T ..... | A     |

**FIG. 5 (cont.)**

|            | 1430             | 1440             | 1450             | 1460             | 1470             | 1480            | 1490              | 1500         | 1510   | 1520 | 1530 | 1540    | 1550 |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-------------------|--------------|--------|------|------|---------|------|
|            | IHBDNF           |                  |                  |                  |                  |                 |                   |              |        |      |      |         |      |
| humano     | AAATAATTTTATGAAC | TGCATGTAATAATGA  | AGTTTATACAGTACAG | TGGTTCACAACTATT  | TATTGGACATGTCATG | ACCAGAGGGAACAGT | CATTGGGCACAACTTAA | AAAGTCTGCATT |        |      |      |         |      |
|            | TTTTTAAATACTTGAC | GTACATATTACTTCAA | ATATGTCATGTCACCA | AGATGTTAGATATAAT | AACCTGTACAGGTACT | GGTCTTCCCTTGTCA | GTAAACCGGTGTAAT   | TTTCAGACGTAA |        |      |      |         |      |
| rato 922   | .G.....          |                  |                  |                  |                  |                 |                   | A.....       | A..... |      |      | T.....  |      |
|            |                  |                  |                  |                  |                  |                 |                   |              |        | TTT  |      | TTTAA   |      |
|            |                  |                  |                  |                  |                  |                 |                   |              |        | ^    |      | ^       |      |
| porco 1012 | .....            |                  |                  |                  |                  |                 |                   | T.....       |        |      |      | AA..... |      |
|            | IHBDNF           |                  |                  |                  |                  |                 |                   |              |        |      |      |         |      |
|            | 1560             | 1570             | 1580             | 1590             | 1600             | 1610            |                   |              |        |      |      |         |      |
| humano     | ACATTCCTTGATAATG | TGTGGTTTGGCGTGG  | CCAGAACTGAAACCGG | AATTCCTGCAG      |                  |                 |                   |              |        |      |      |         |      |
|            | TGTAAGGAACATTACA | CACCAACCGCAACGG  | TCTTGACTTTGGCTT  | AAGGACGTC        |                  |                 |                   |              |        |      |      |         |      |
| rato 1050  | .....C.....      |                  |                  |                  |                  | T.....          | AA..              |              |        |      |      |         |      |
| porco 1140 | .....C.....      |                  |                  |                  |                  |                 |                   |              |        |      |      |         |      |

FIG. 5 (cont.)

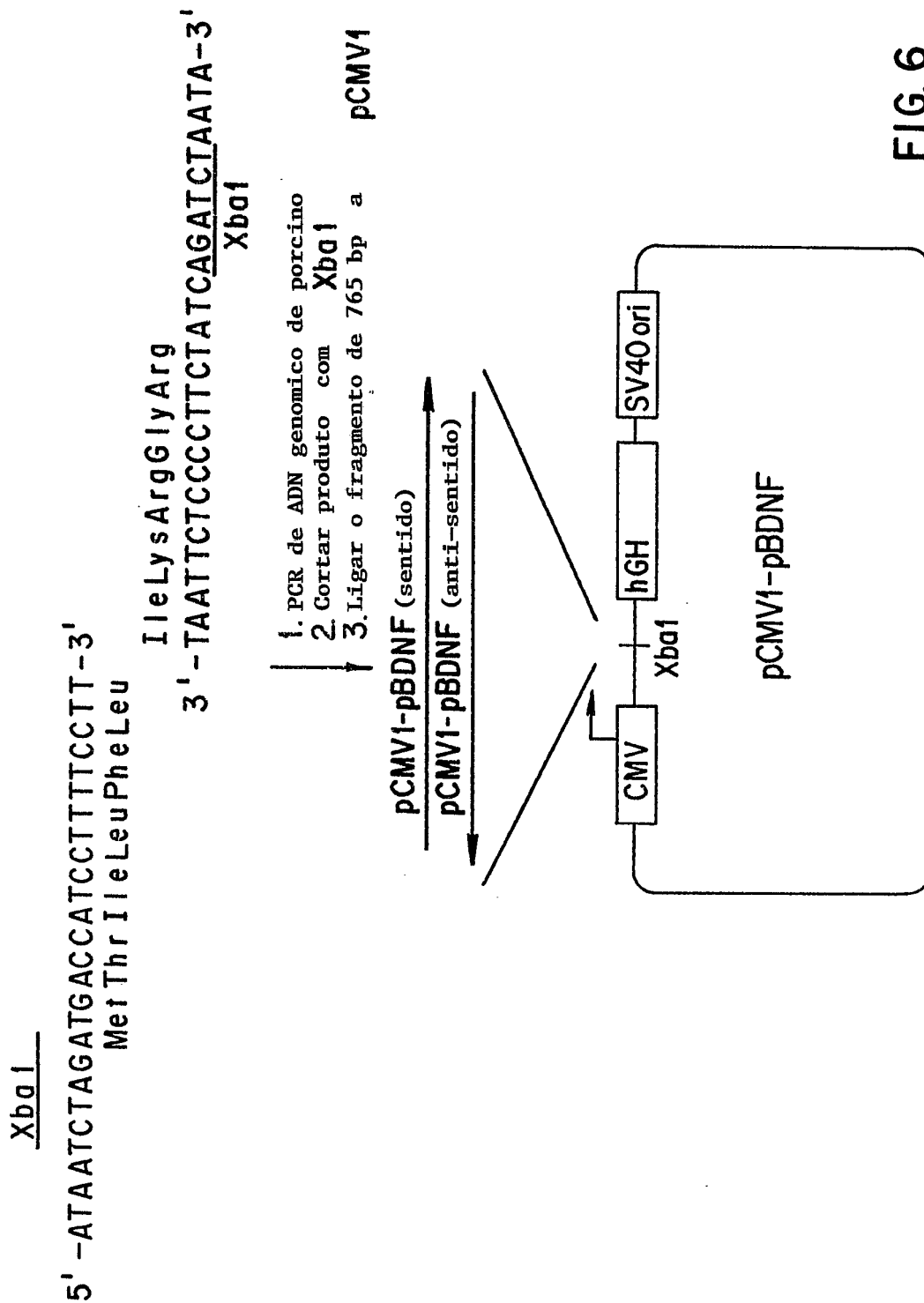
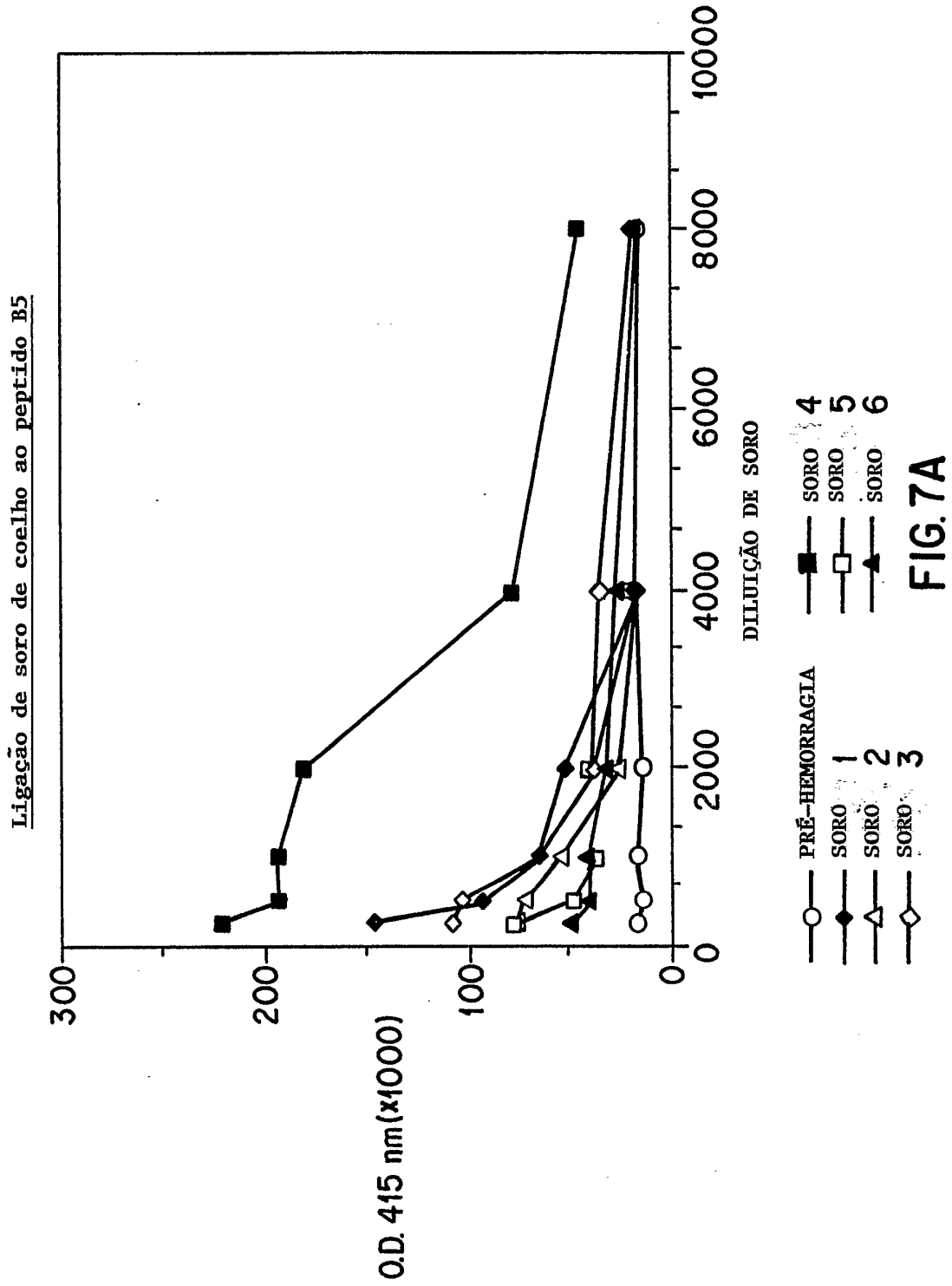


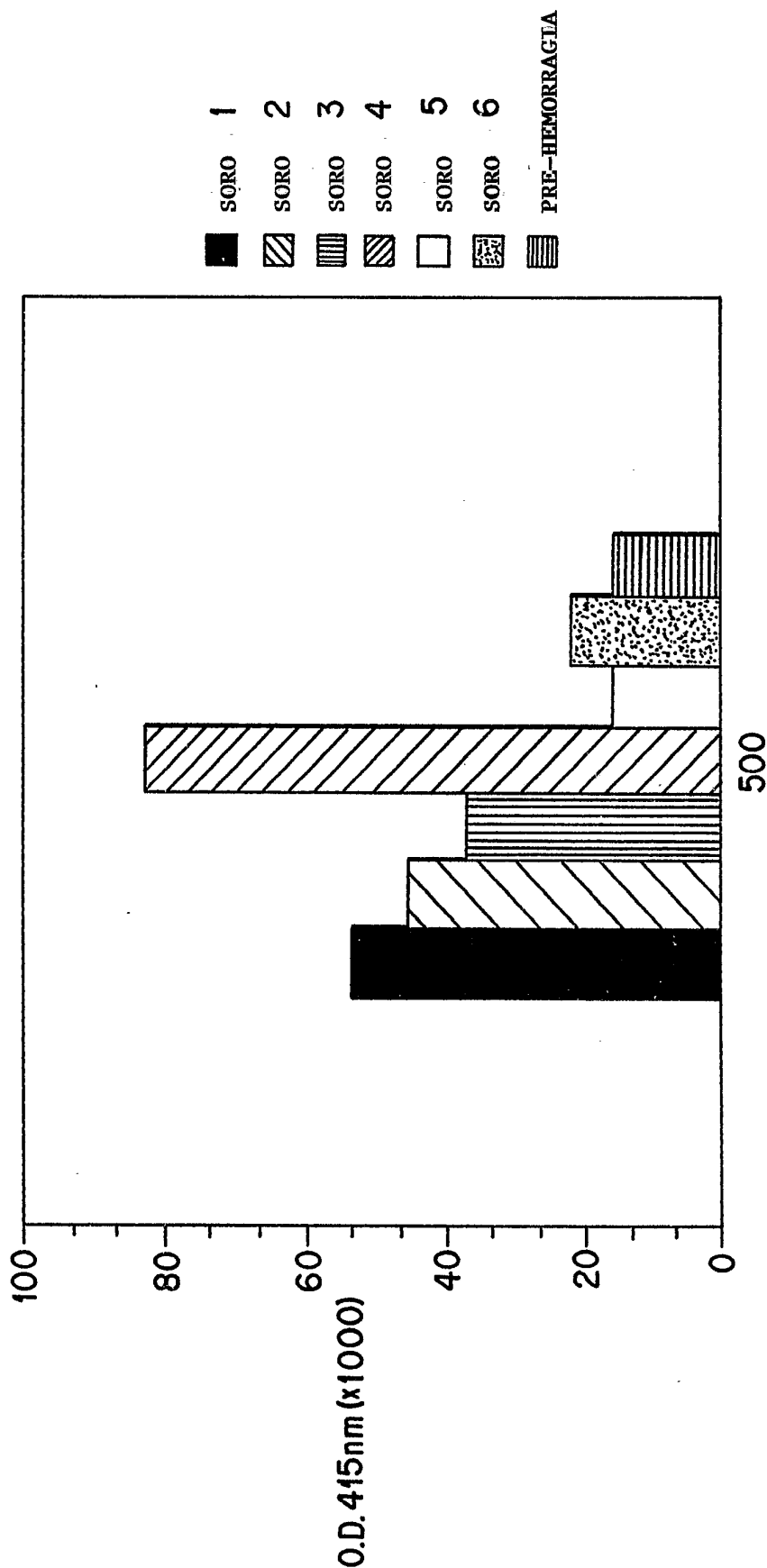
FIG. 6

*[Handwritten signature]*





DILUIÇÃO A 1/500 DE SORO DE COELHO QUE SE LIGA A 50 ng DE BDNT



DILUIÇÃO DO SORO

FIG. 7B

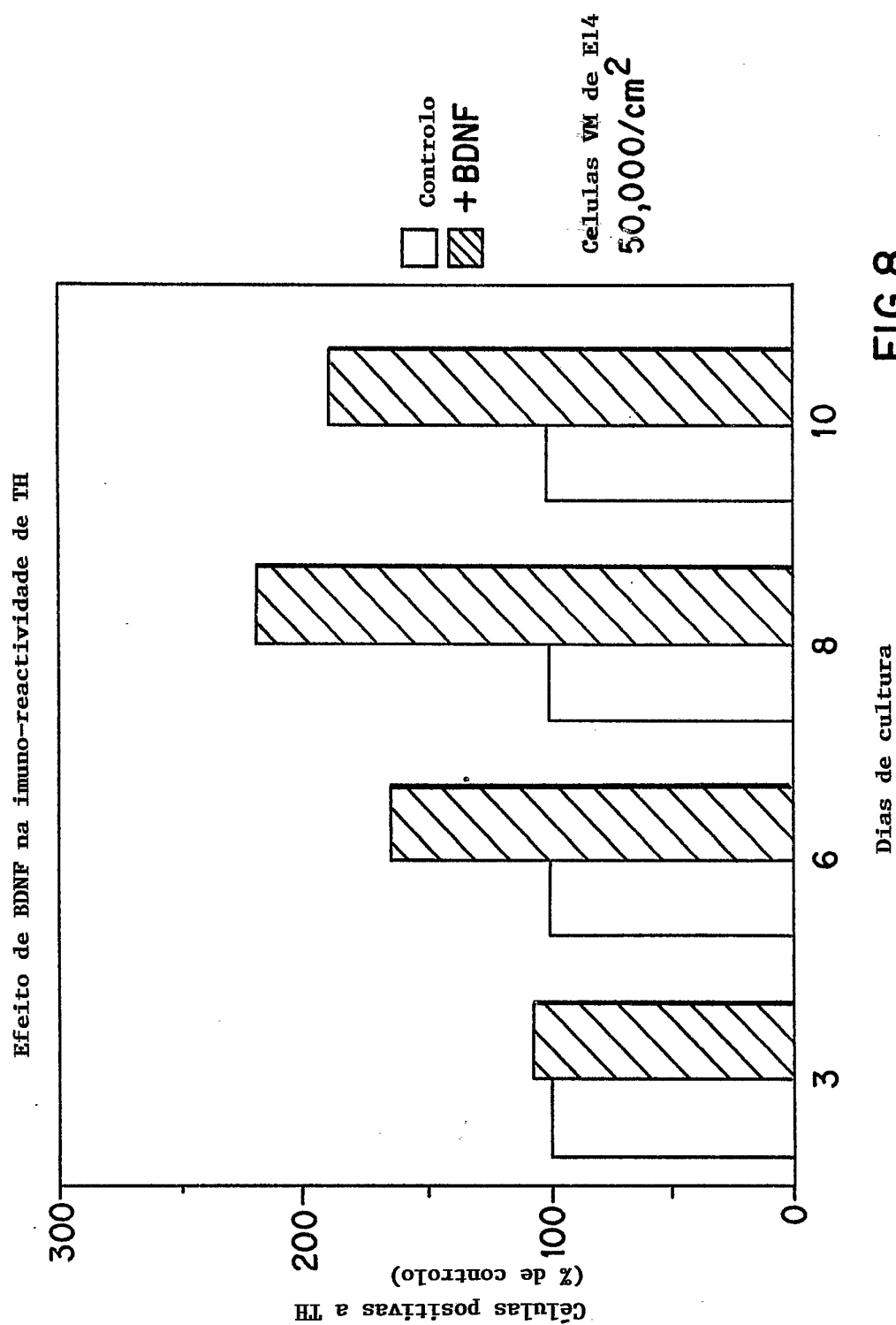


FIG. 8

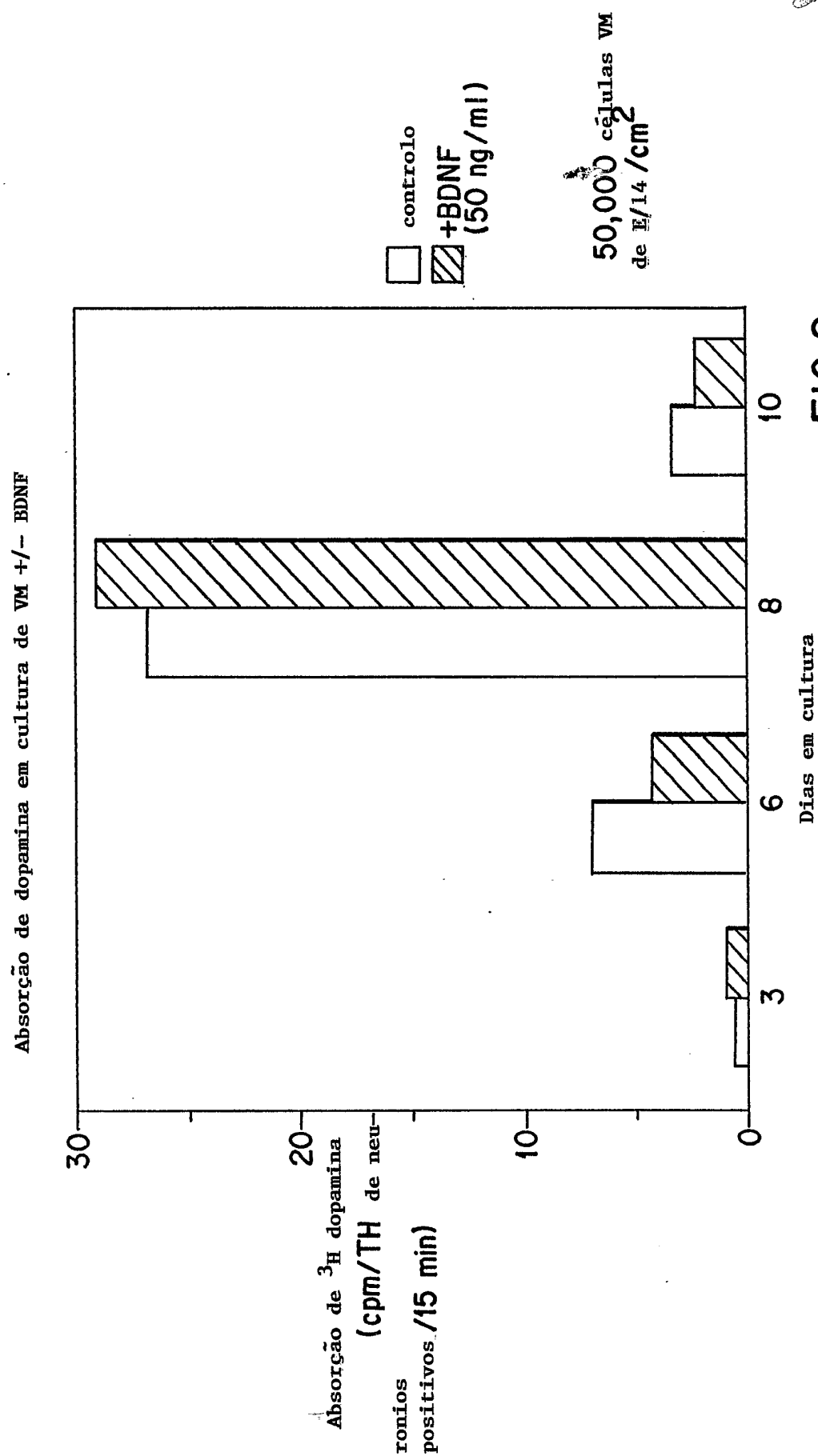


FIG. 9

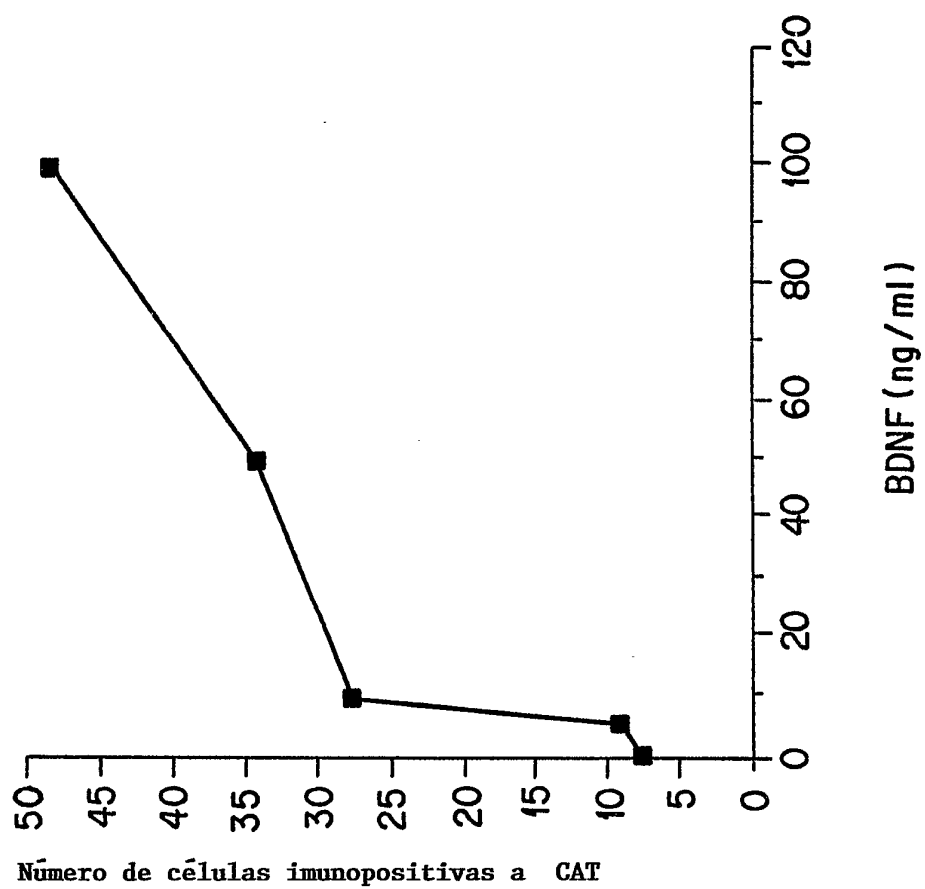


FIG. 10A

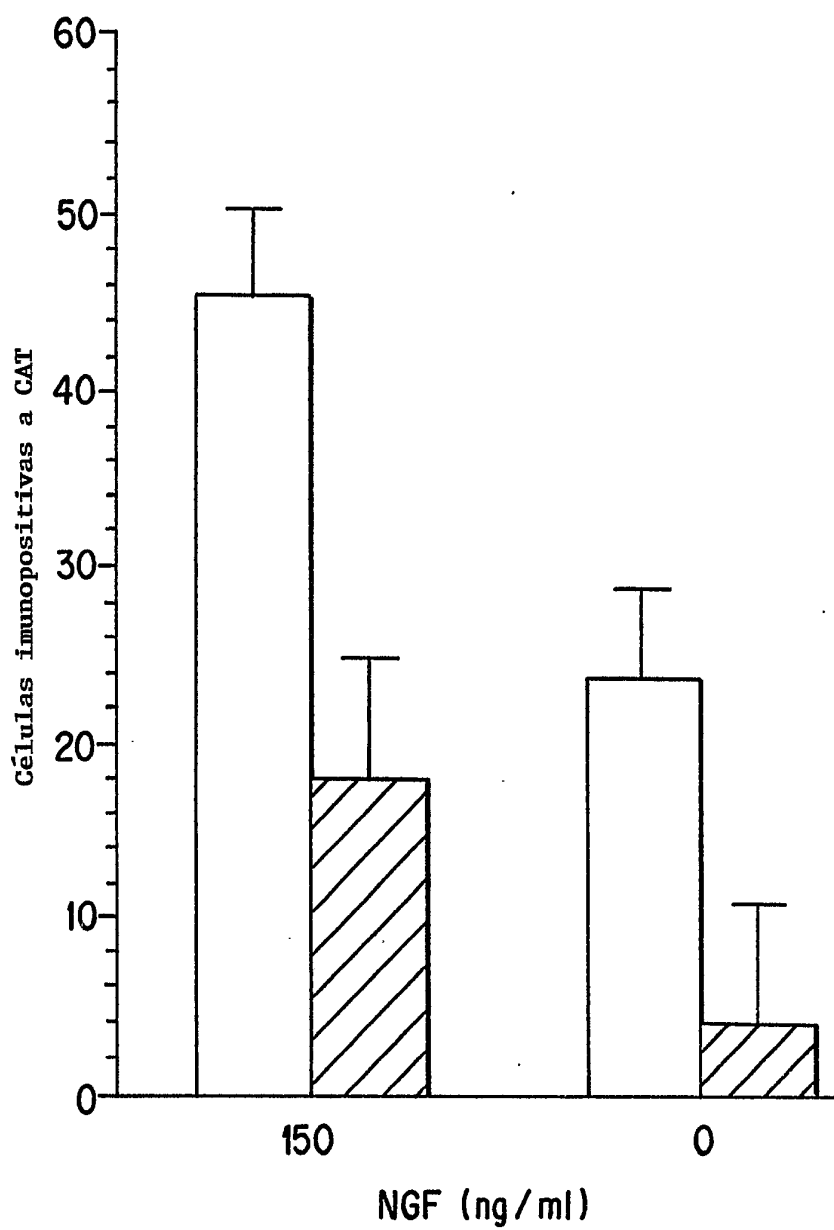


FIG. 10B

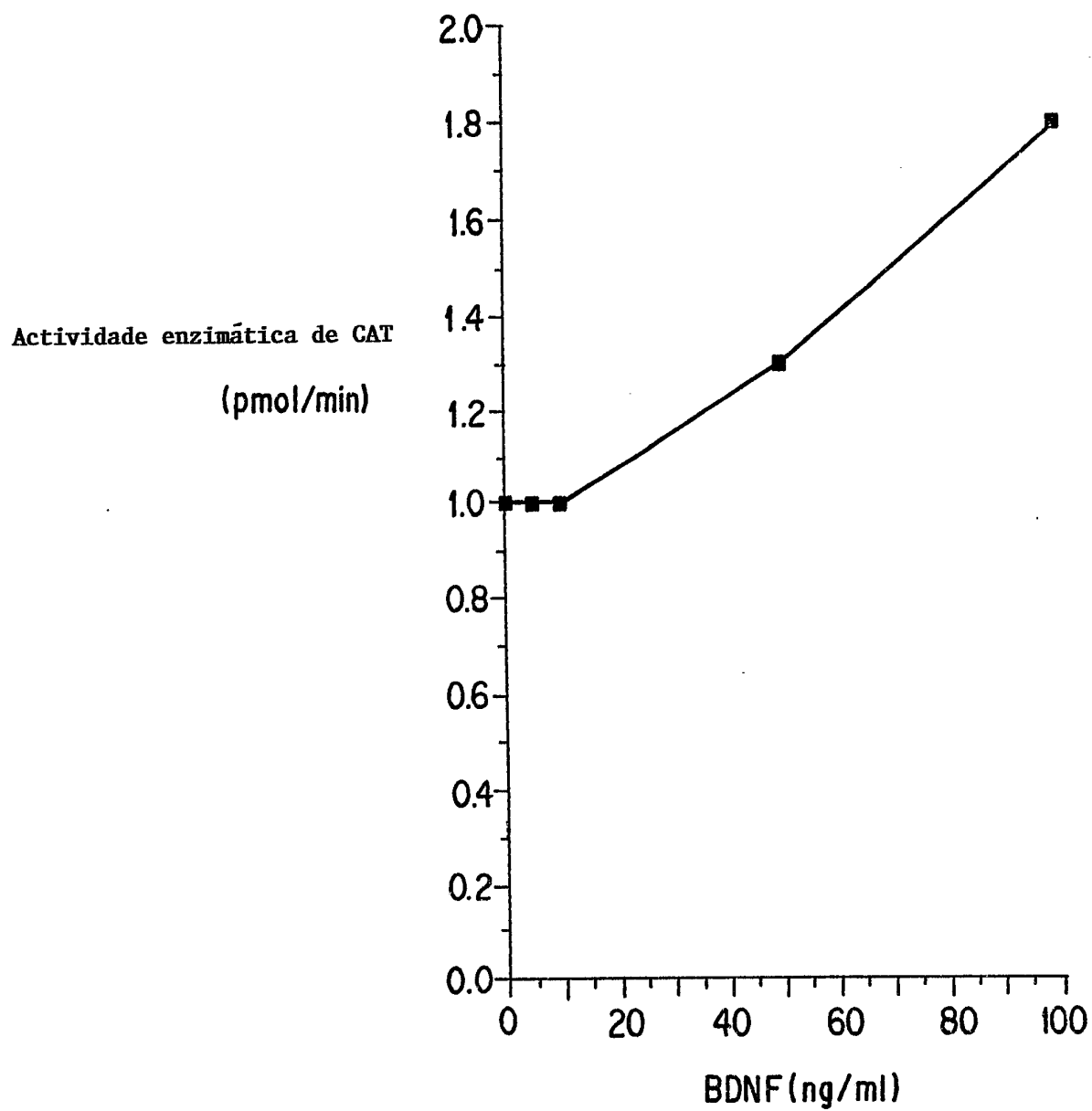


FIG.11

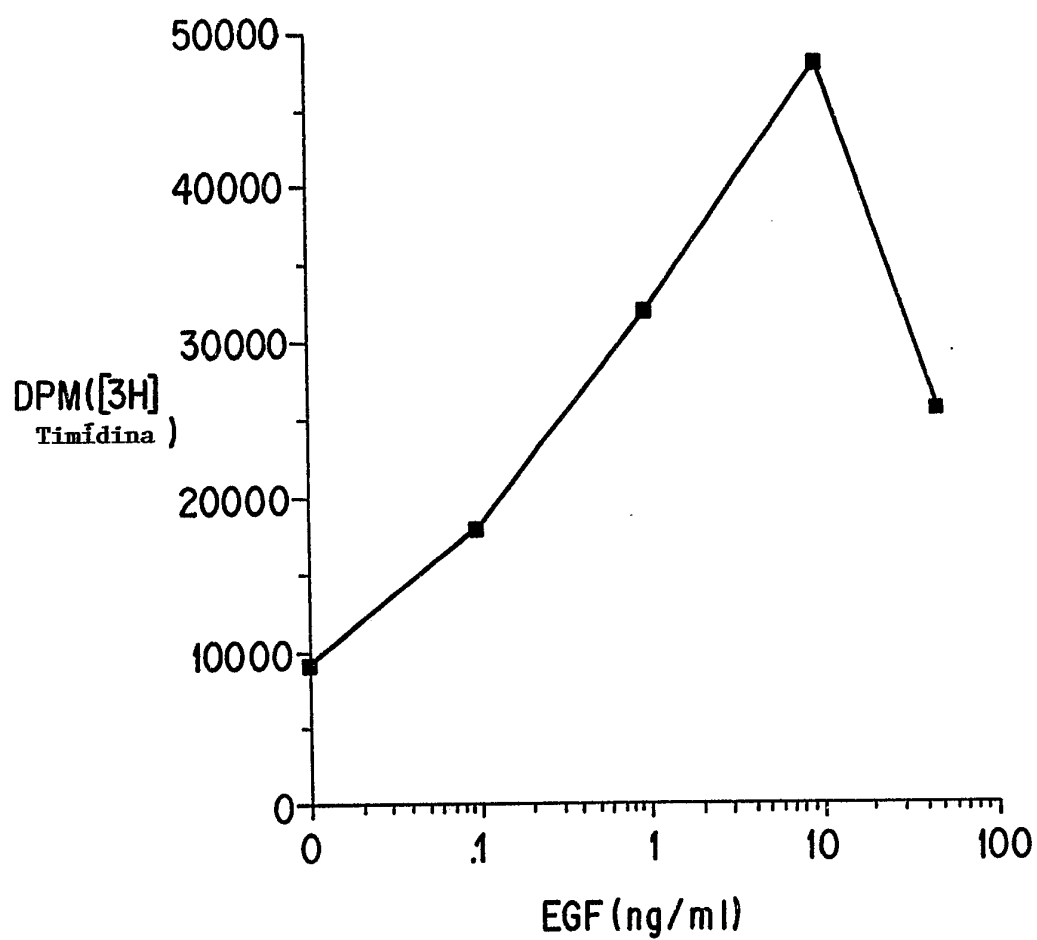
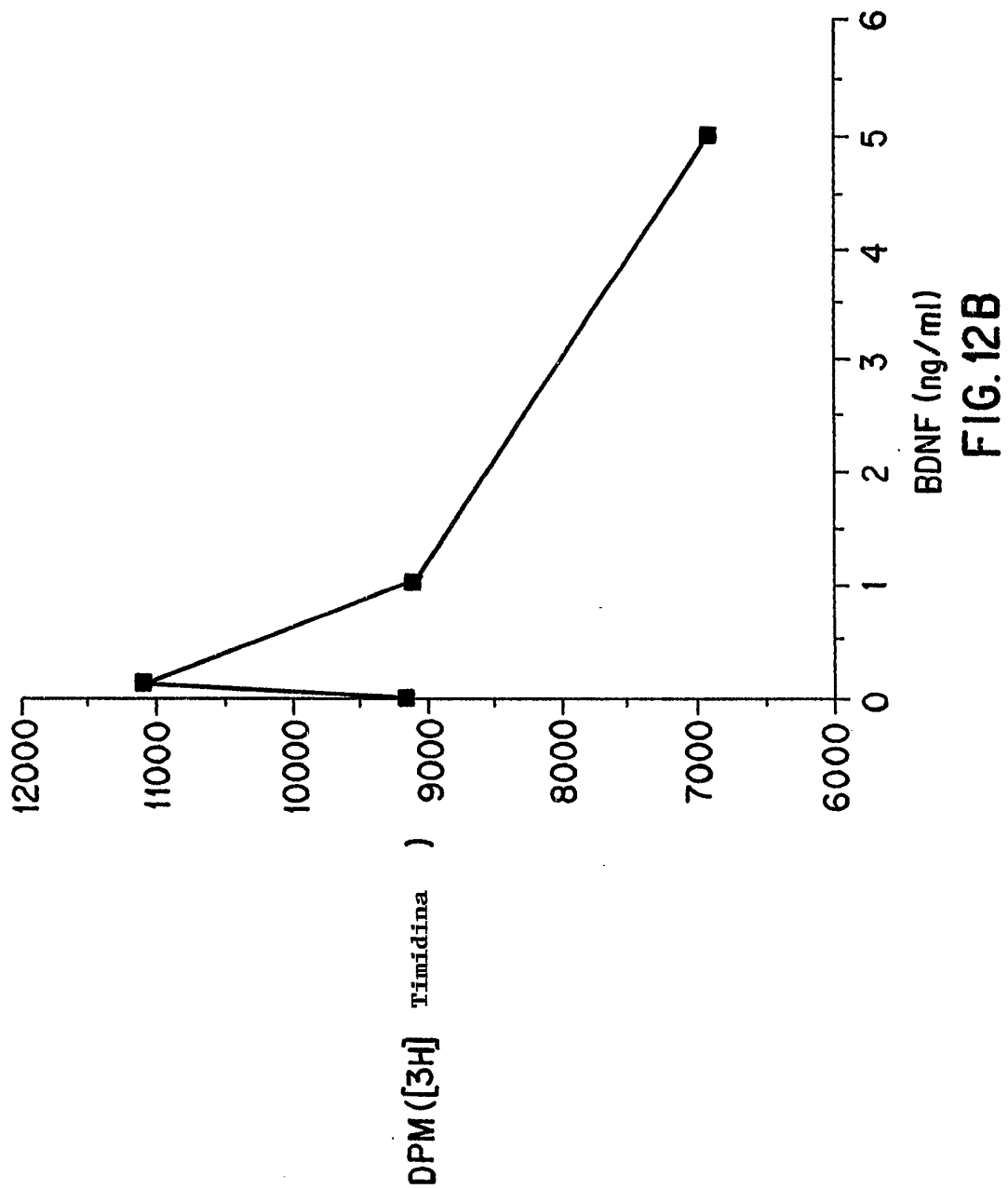
*Handwritten signature*

FIG. 12A

*[Handwritten signature]*



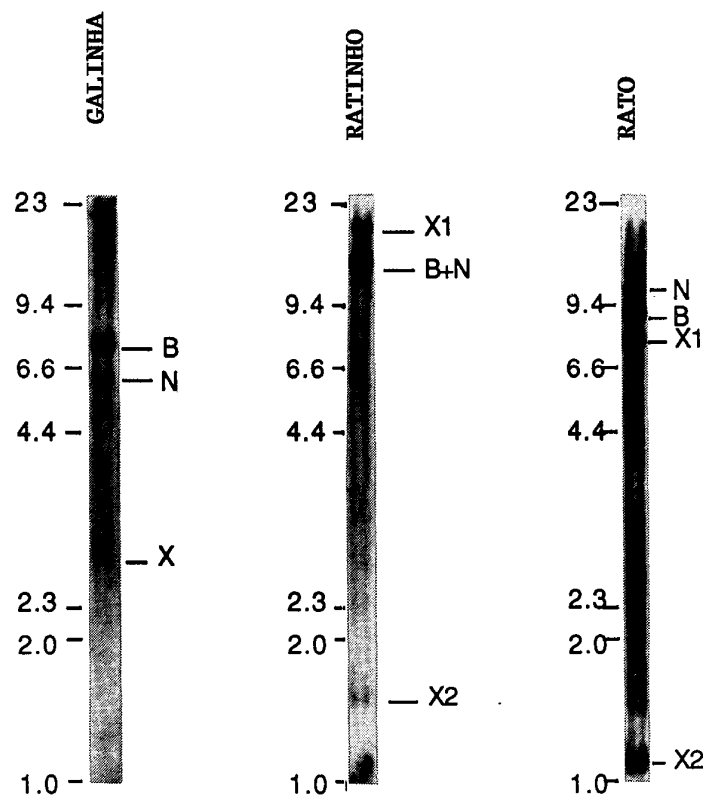


FIG. 13



M3/4    GAT GAC AAA CAC TGG AAC TCT CAG TGC AAA ACT TCG CAA ACC  
          Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr

MuNGF   Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr

HuBDNF   Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr Thr Gln Ser

M3/4    TAT GTC CGA GCA CTG ACT TCA GAA AAC AAC AAA CTC GTA GGC  
          Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly

MuNGF   Phe Val Lys Ala Leu Thr Thr Asp --- Glu Lys Gln Ala Ala

HuBDNF   Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile Gly

M3/4    TGG CGC TGG ATA CGA ATA GAC ACT TCC TGT GTG TGT GCC TTG  
          Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu

MuNGF   Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu

HuBDNF   Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr Leu

M3/4    TCG AGA AAA ATT GGA AGA ACA TGA ATT GGC ATC TGT CCC CAC  
          Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr

MuNGF   Ser Arg Lys Ala Thr Arg Arg Gly

HuBDNF   Thr Ile Lys Arg Gly Arg

M3/4    ATA TAA ATT GAT TGG ACT NNA AAT TAT ATG ATA TGC ATG TAG

M3/4    CAT ATA AAT GTT TAT ATT TTT ATA TAT TAT AAG TTG ACC TCT

M3/4    ATT TAT TAA ACT TCA GCA ACC CTT

**FIG. 14**

*[Handwritten signature]*

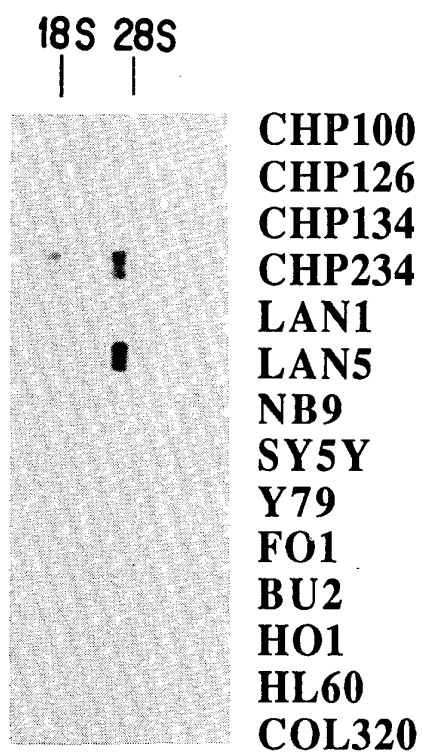


**FIG. 15**

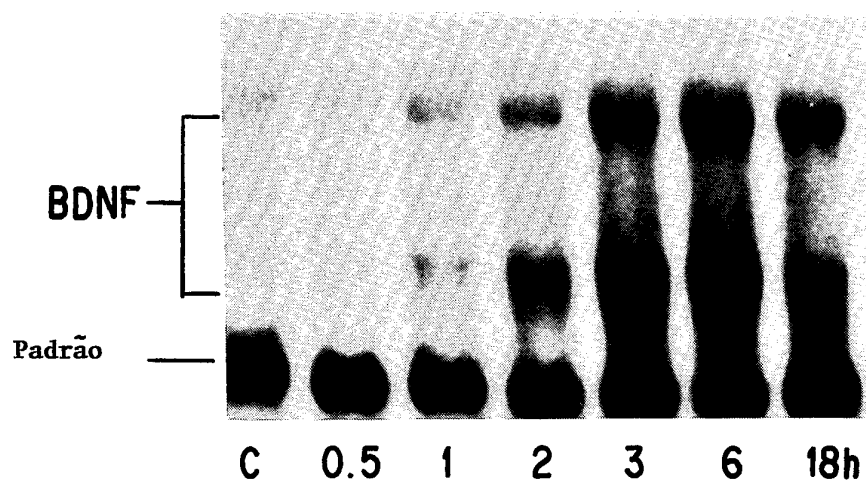


**FIG. 16A**

*[Handwritten signature]*

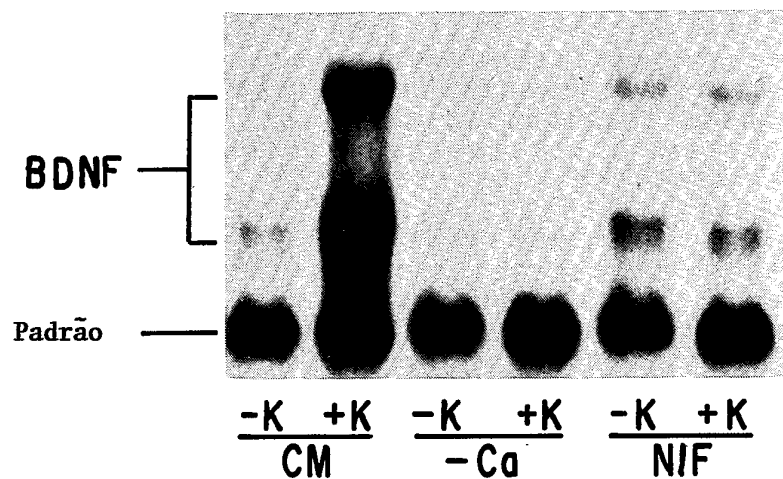


**FIG. 16B**

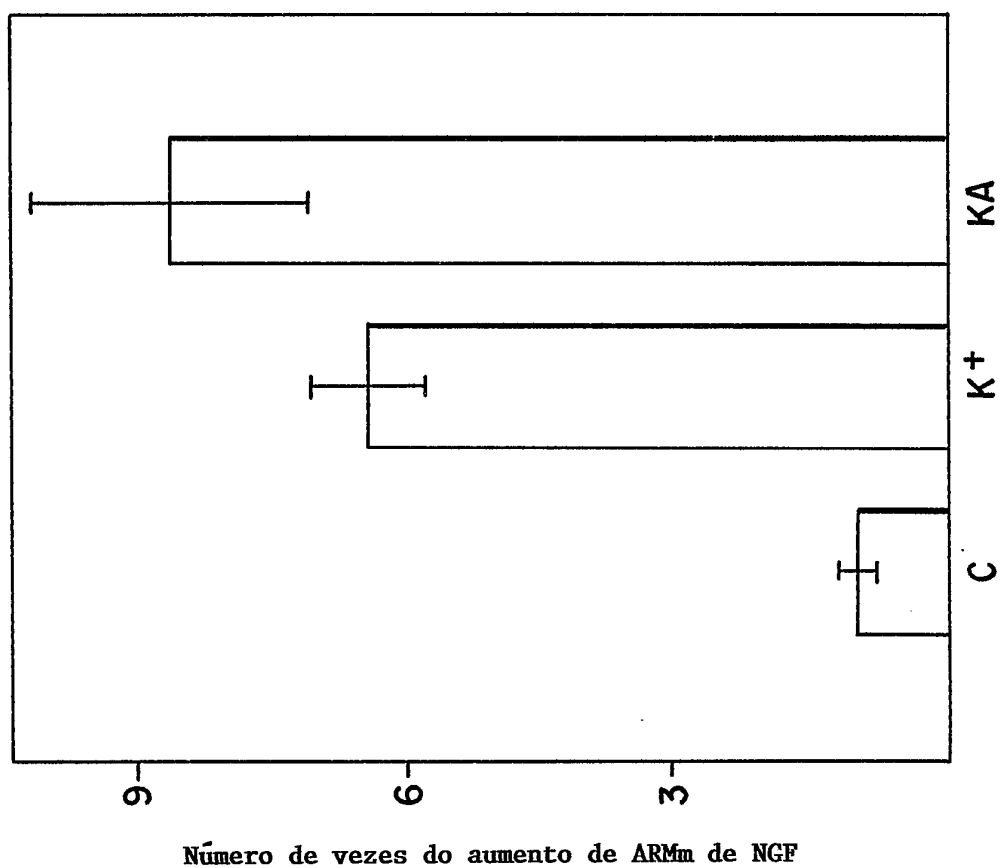
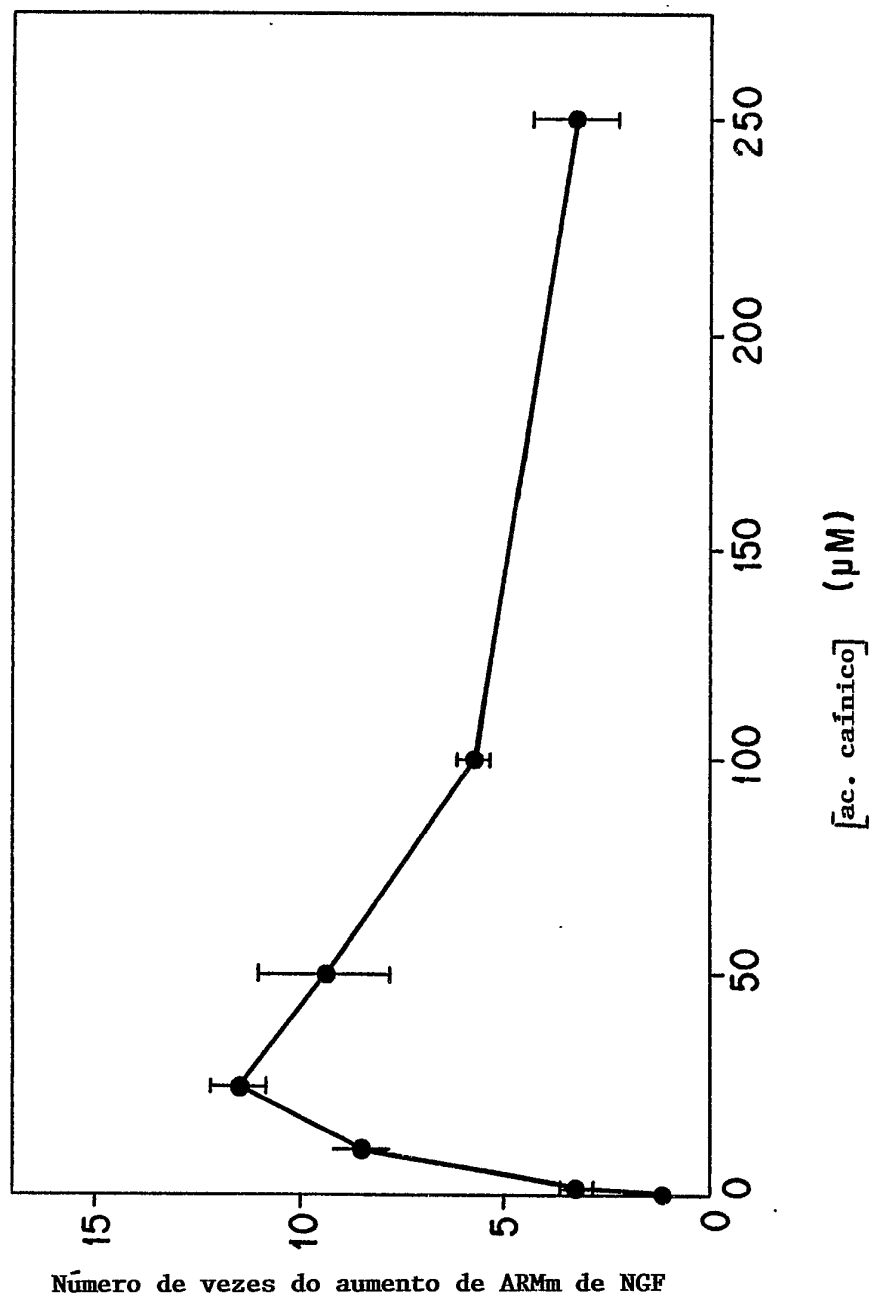


FIG.17



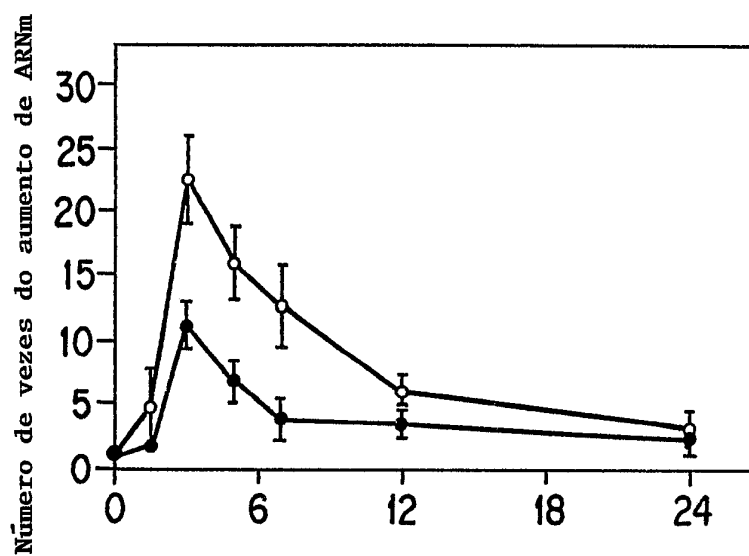


FIG. 19 A

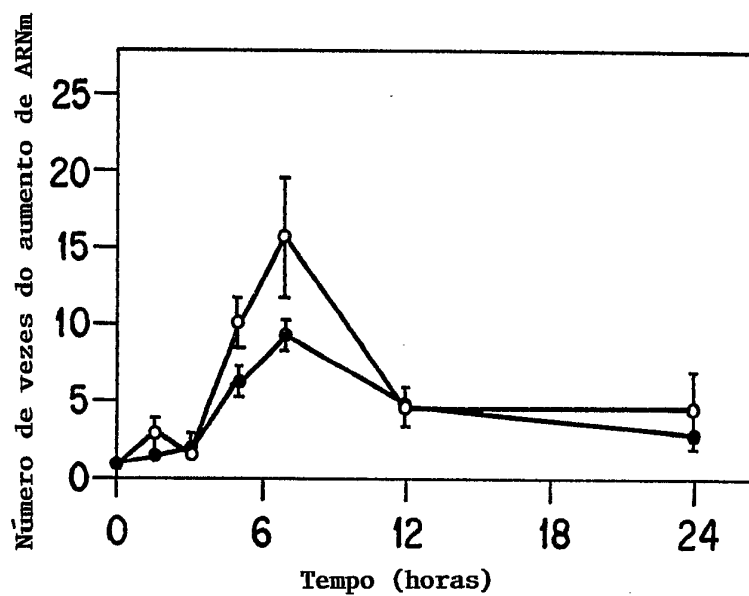


FIG. 19B

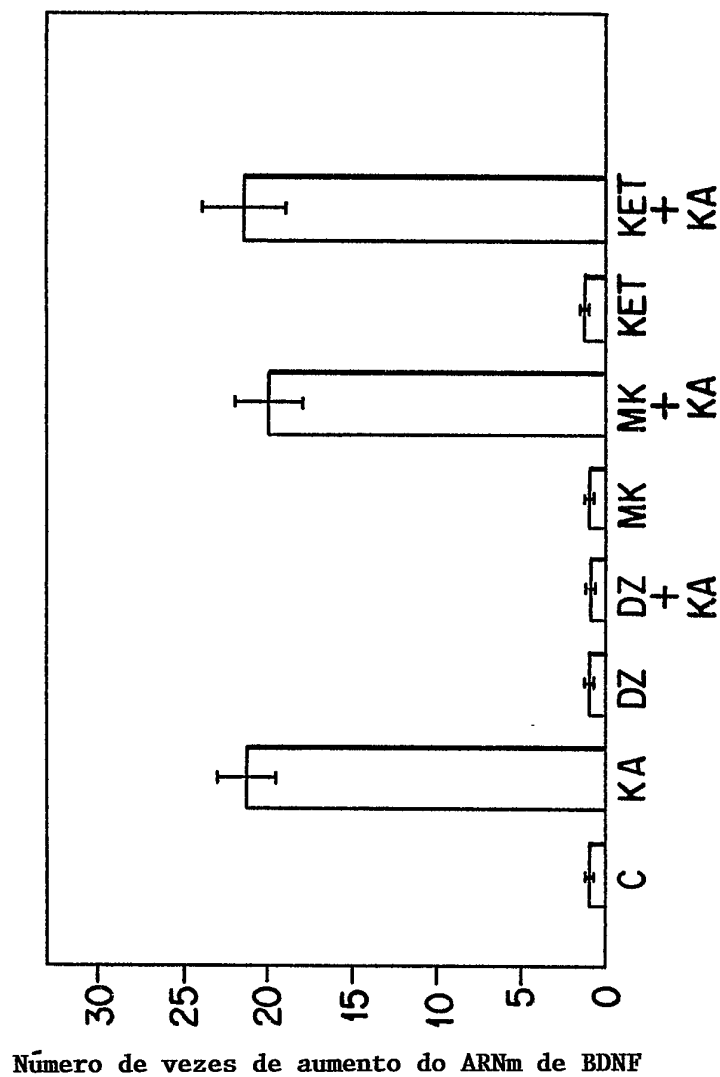


FIG. 20

*Handwritten signature*

**FIG.21A**



**FIG.21B**

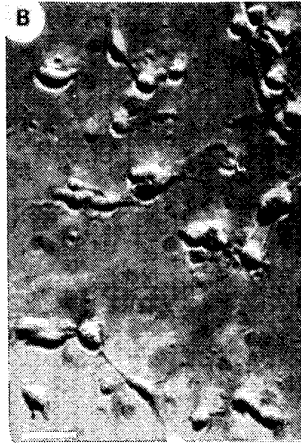


**FIG.21C**



**FIG.21D**



**FIG.21E**

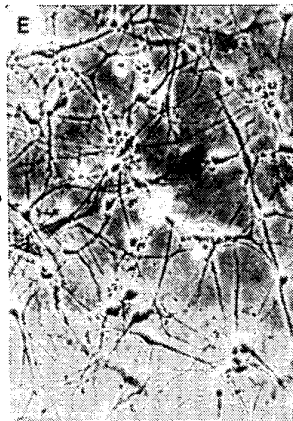
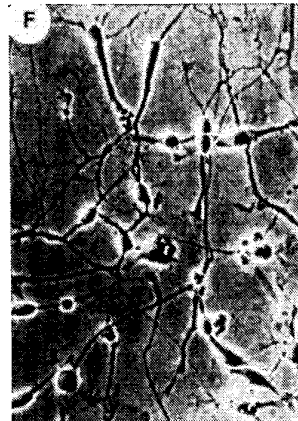


**FIG.21F**



*Handwritten signature or scribble*

**FIG.21G**

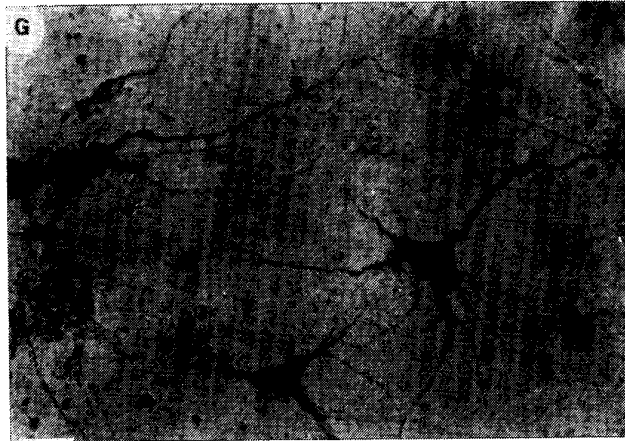


**FIG.21H**

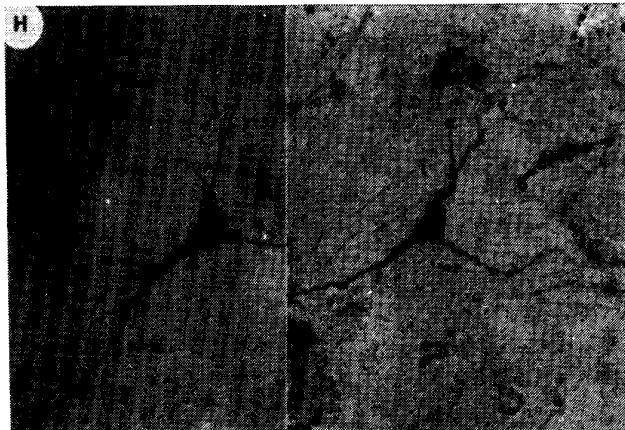
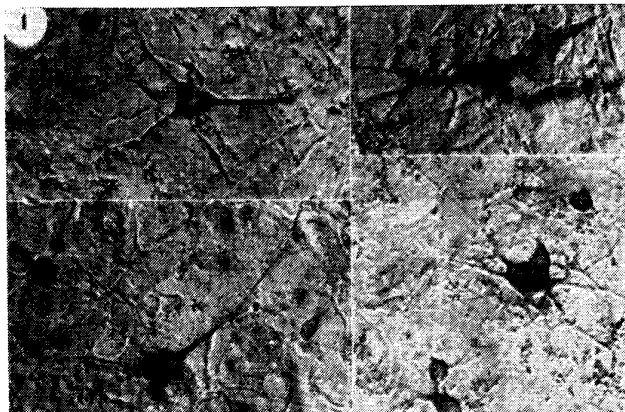


**FIG.21I**



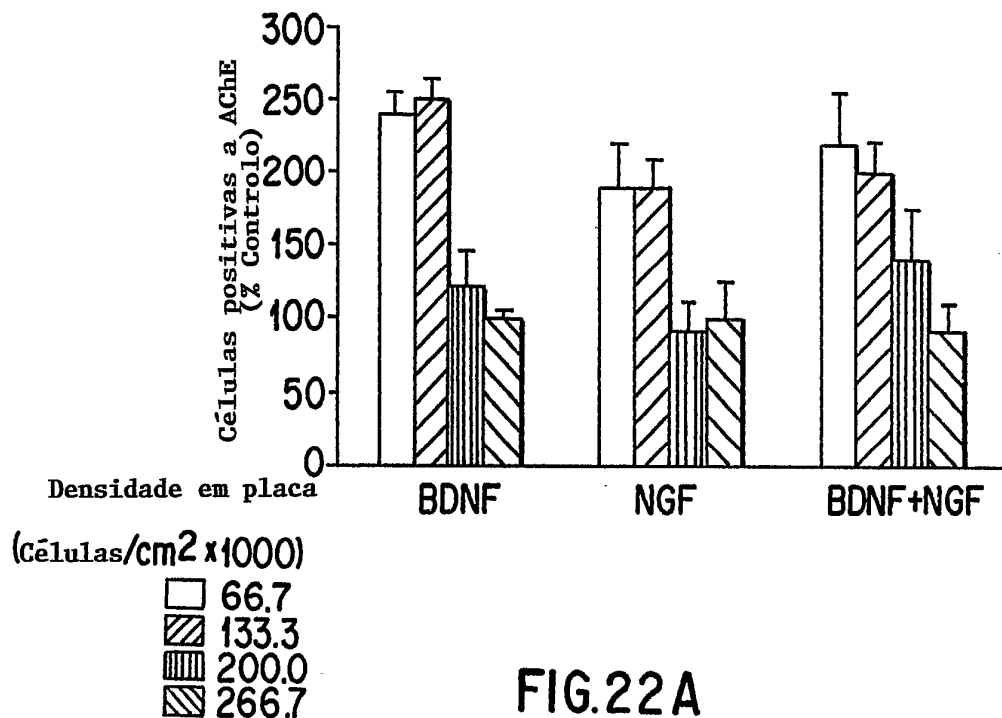


FIG.22A

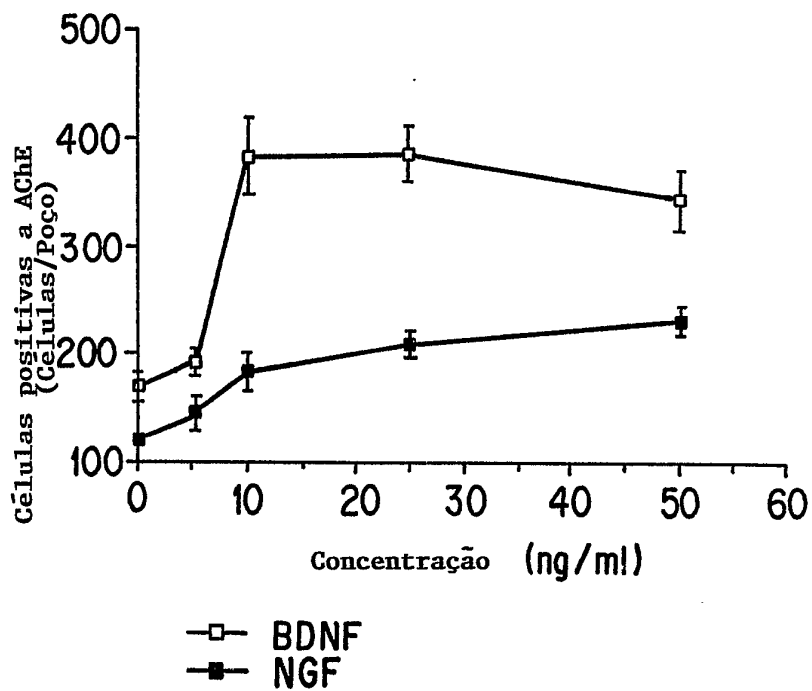


FIG. 22 B

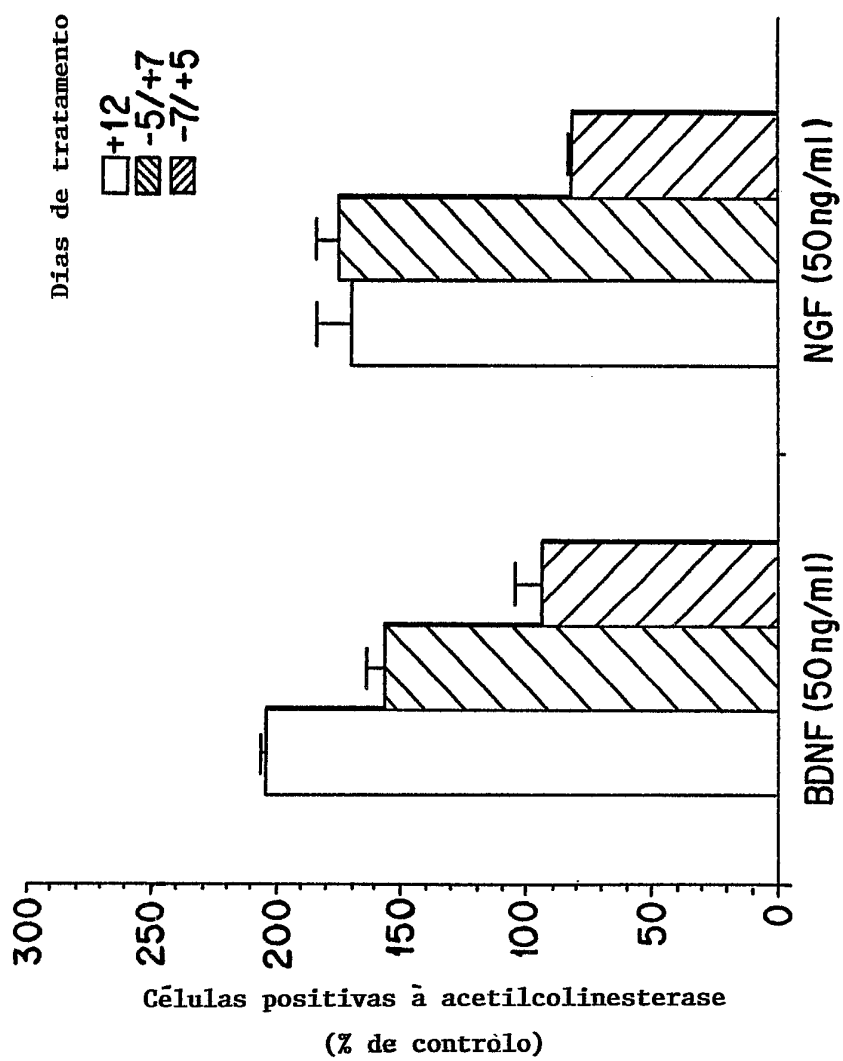


FIG. 23

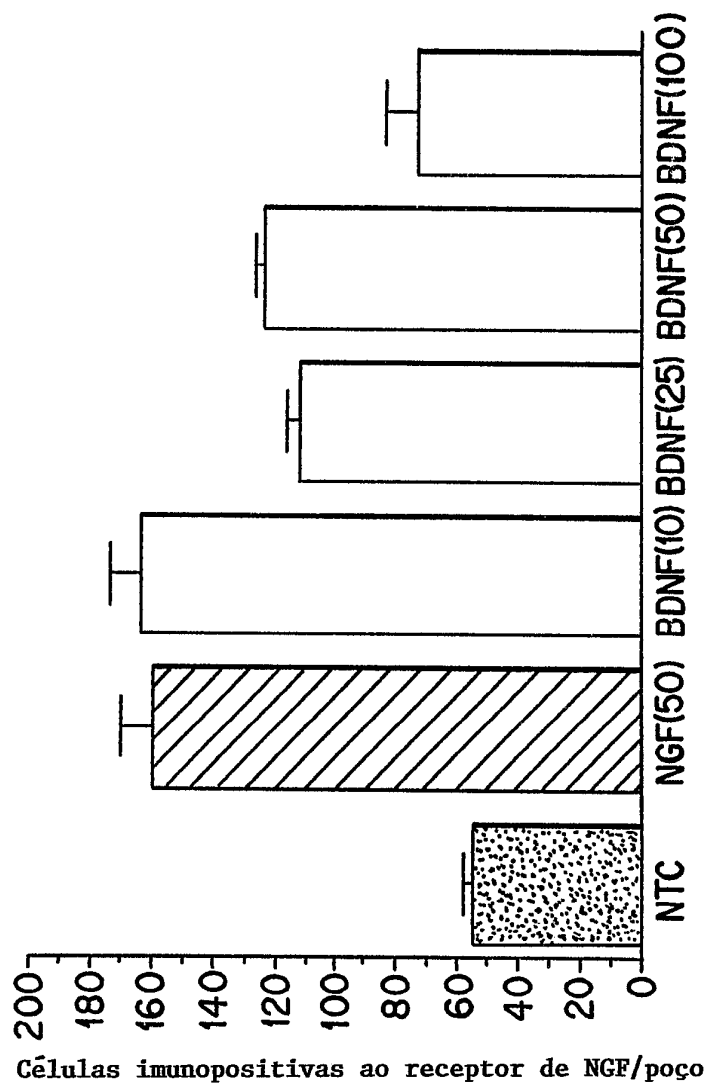


FIG. 24

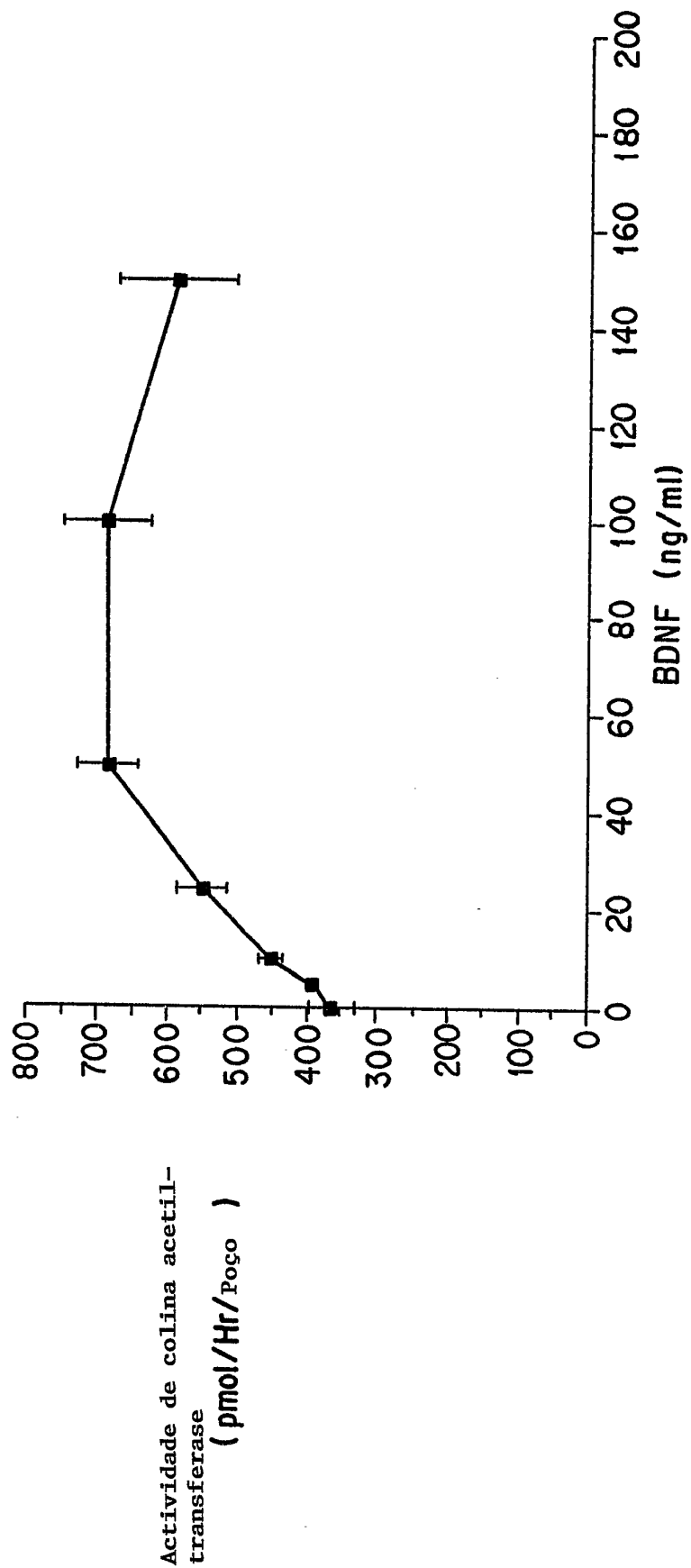


FIG. 25A

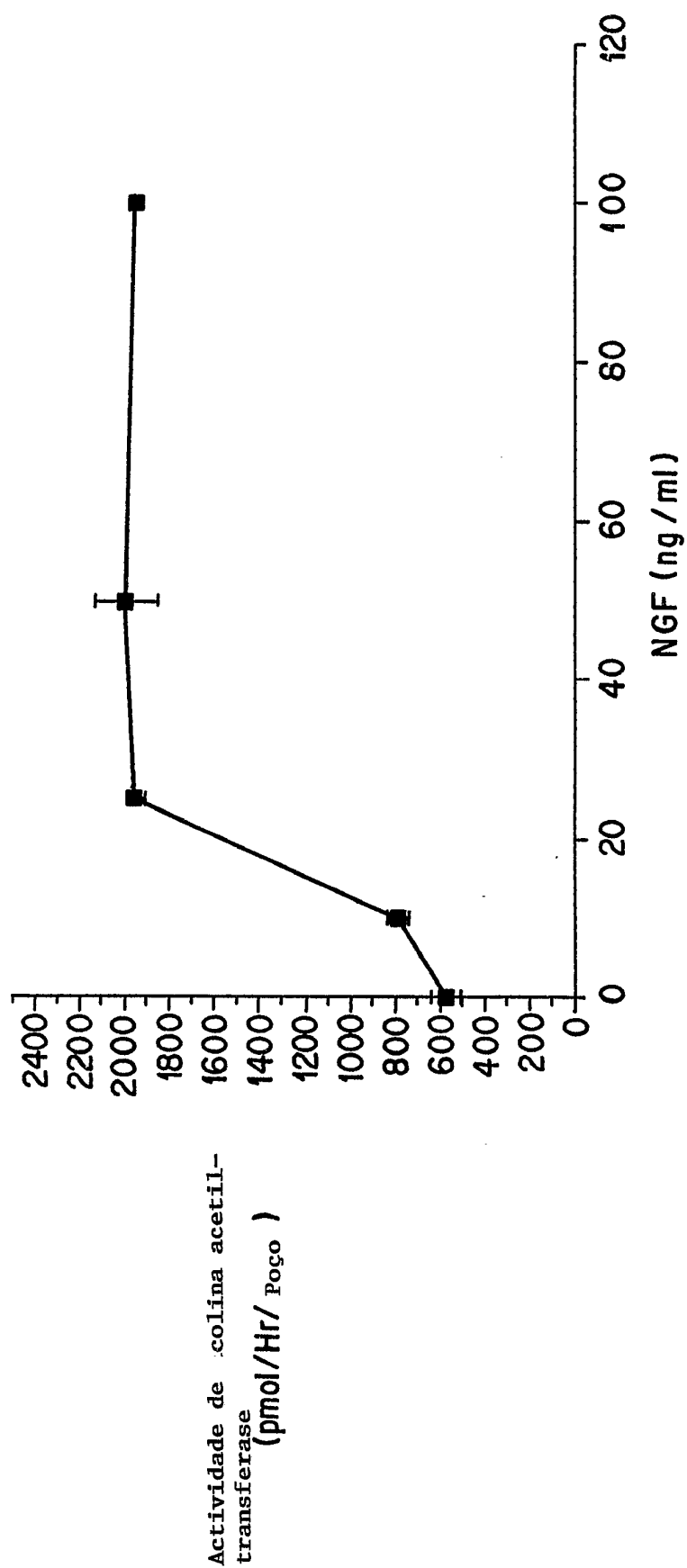


FIG. 25B

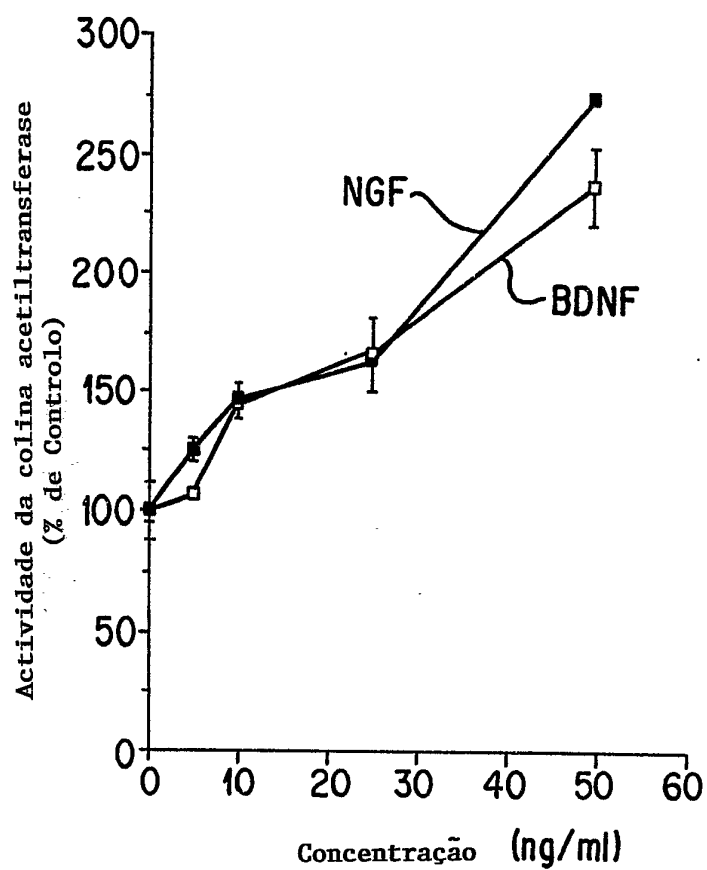


FIG. 26

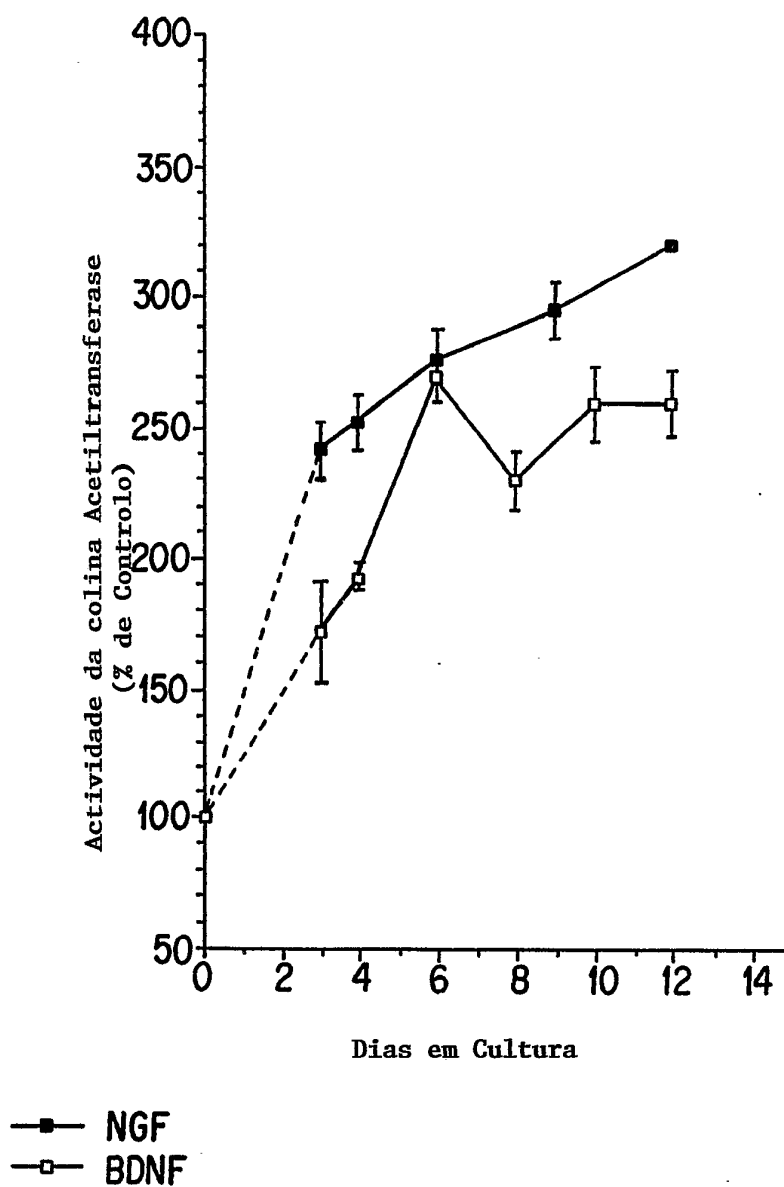


FIG. 27

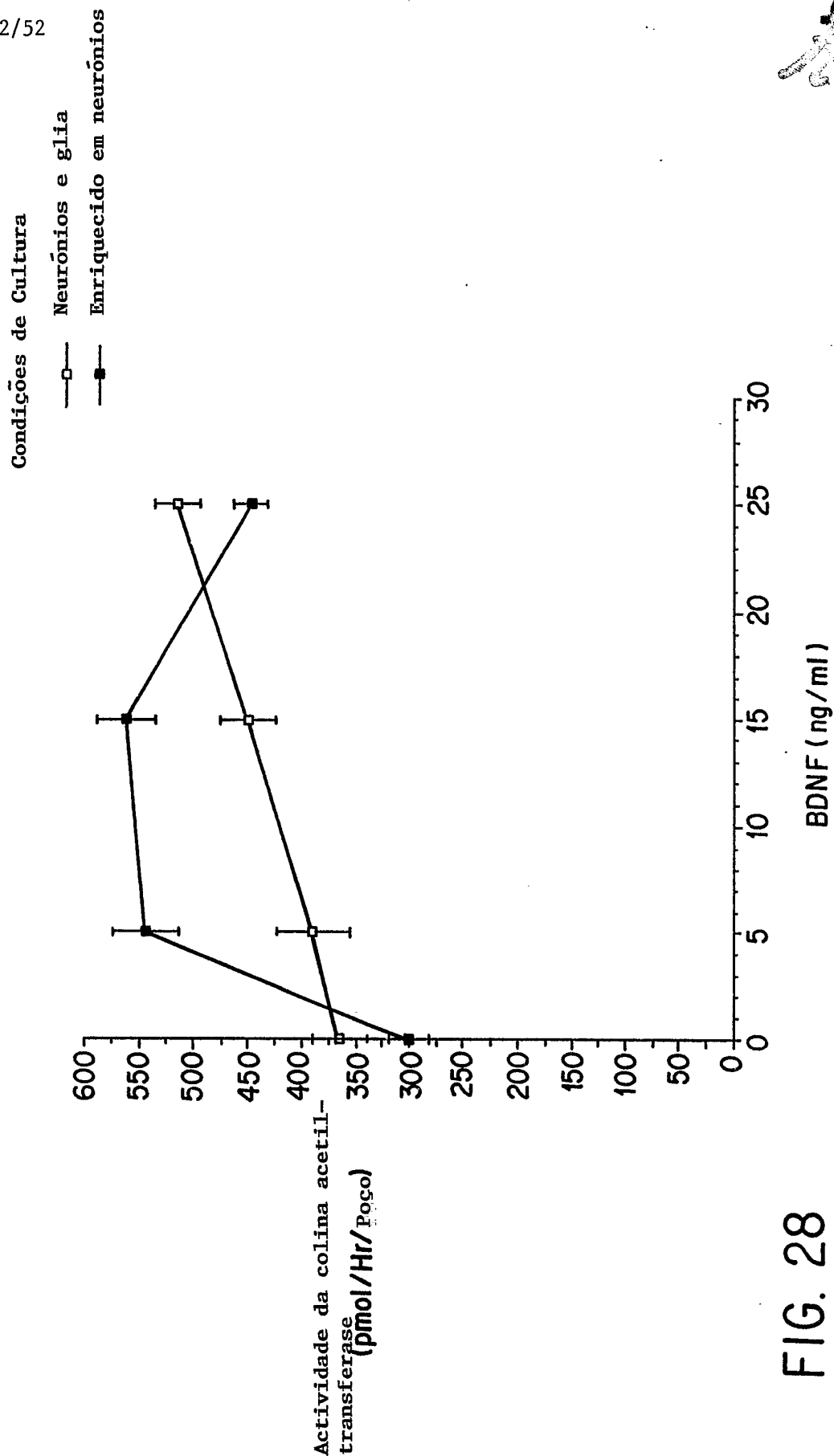


FIG. 28

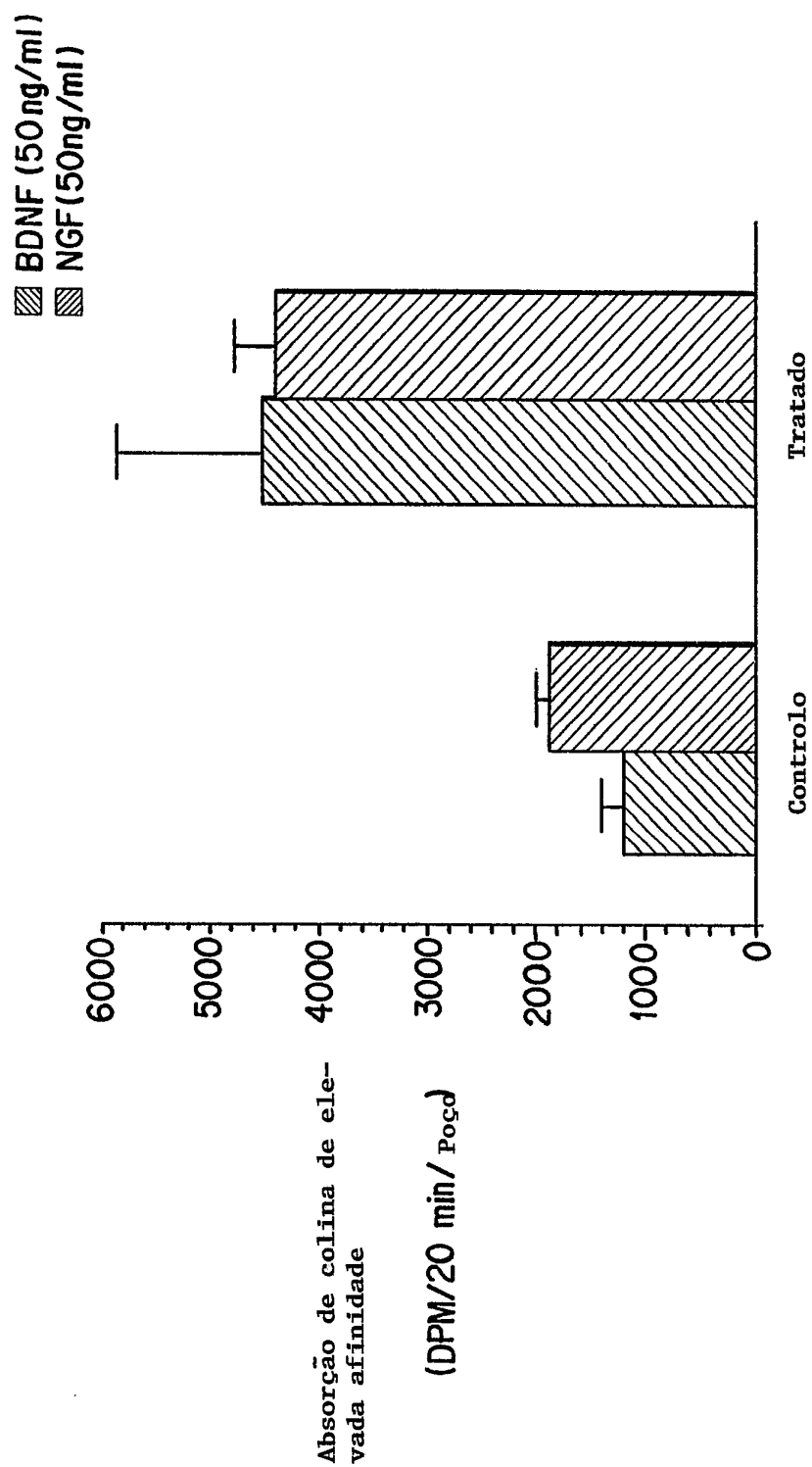


FIG. 29

Conclusão da experiência: Pode usar-se endoproteínase Arg-C purificada numa reacção enzimática *in vitro* para gerar a forma bioactiva madura do factor neurotrófico derivado de cérebro humano, recombinante. A forma processada de hBDNF é mais activa biologicamente do que a forma não processada. Este novo método permitirá uma produção em larga escala, eficiente, de BDNF humano bioactivo em sistemas de cultura de células de mamífero. Por exemplo, pode ser possível imobilizar a endoproteínase Arg-C numa matriz sólida e estabelecer um passo de cromatografia de coluna eficiente.

Figura 1. Resolução por SDS PAGE de produtos de reacção marcados com  $^{35}\text{S}$  da clivagem enzimática de factor neurotrófico derivado de cérebro humano por tripsina e endoproteínase Arg-C.

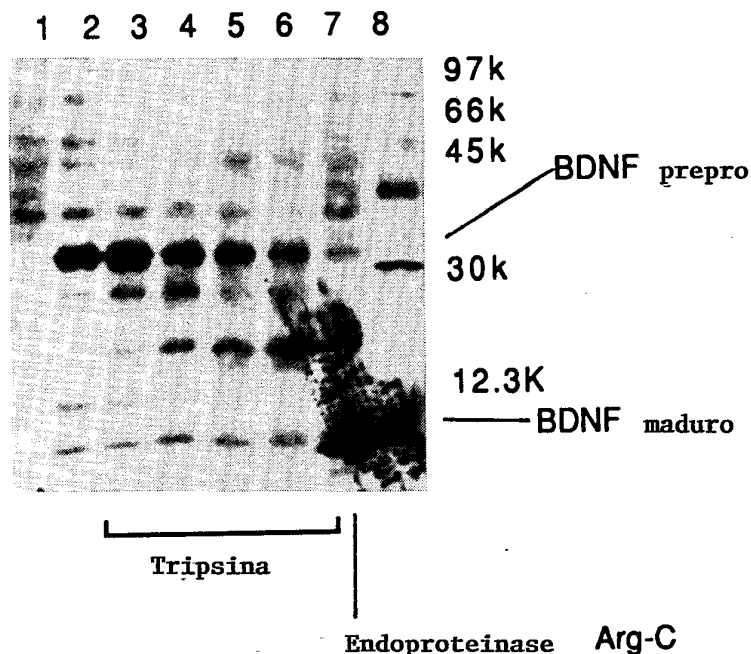


**FIG. 30**

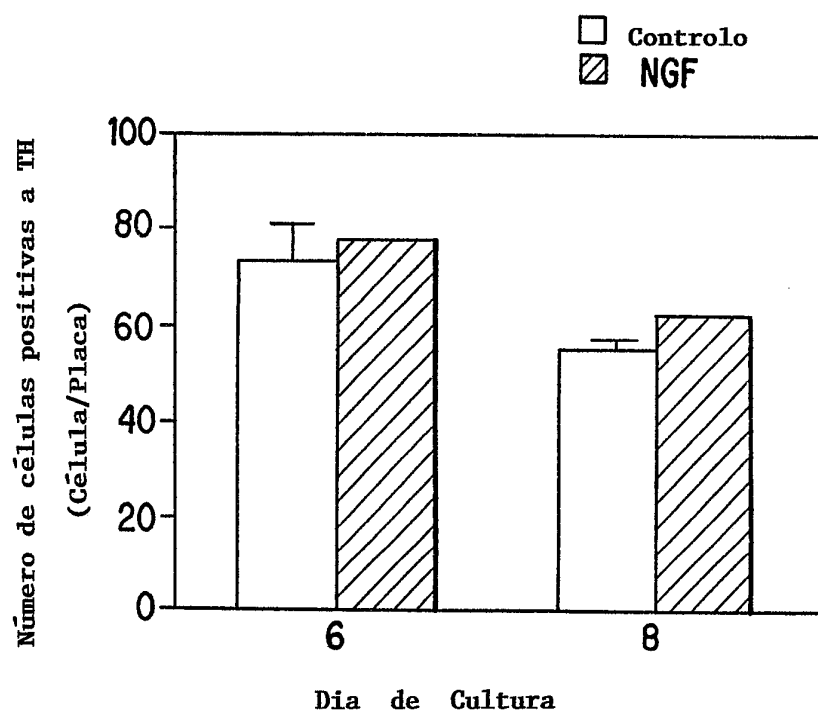


FIG. 34C

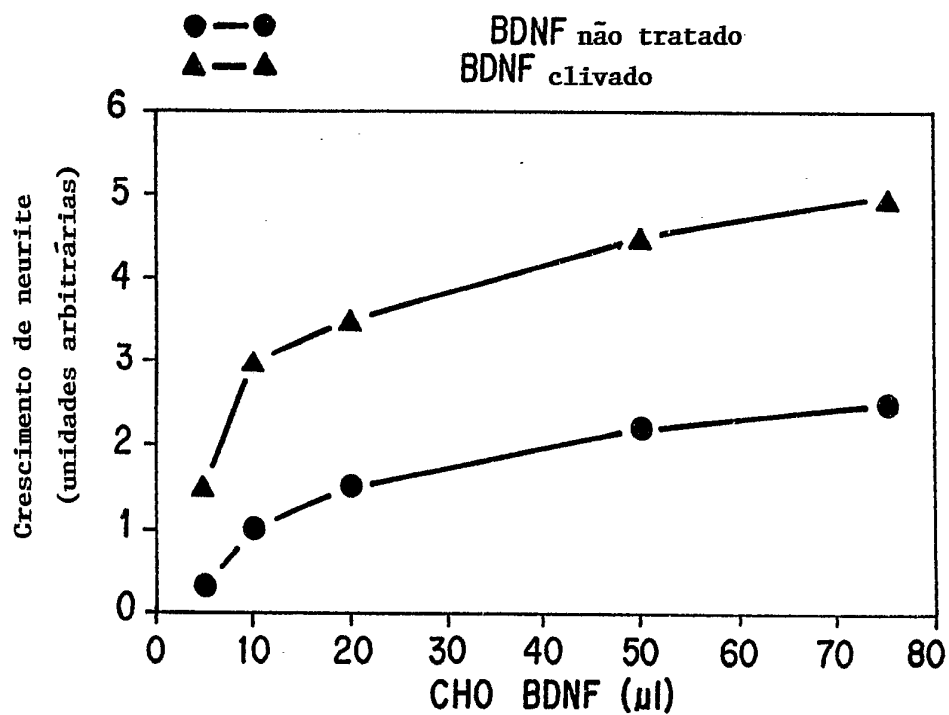


FIG. 31

*sl*

**FIG. 32 A**



**FIG. 32 B**

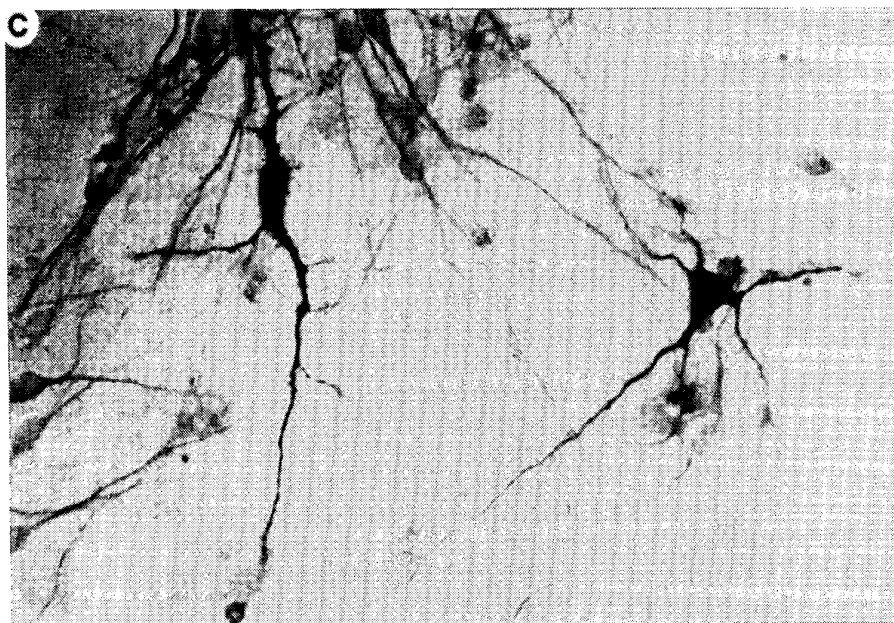
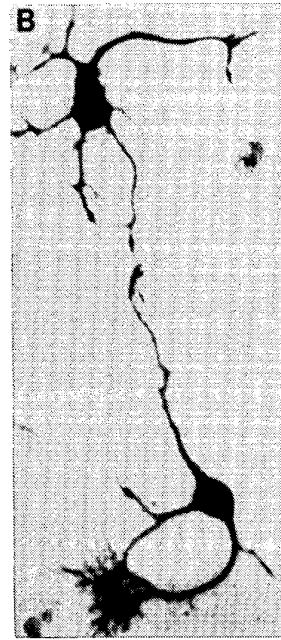


**FIG. 32 C**

*[Handwritten signature]*

**FIG. 33A**

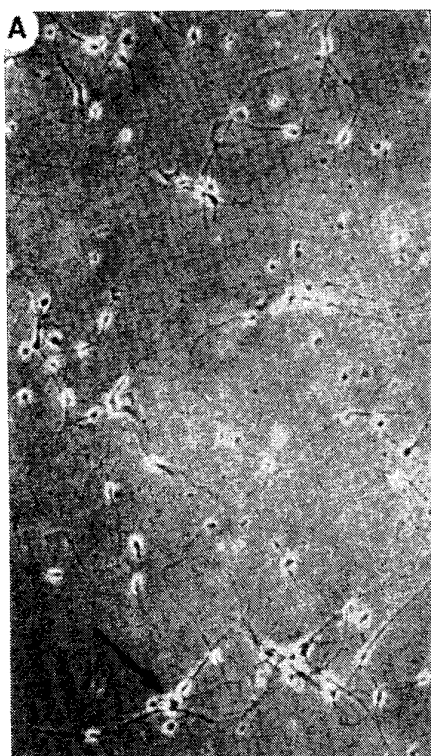


**FIG. 33B**

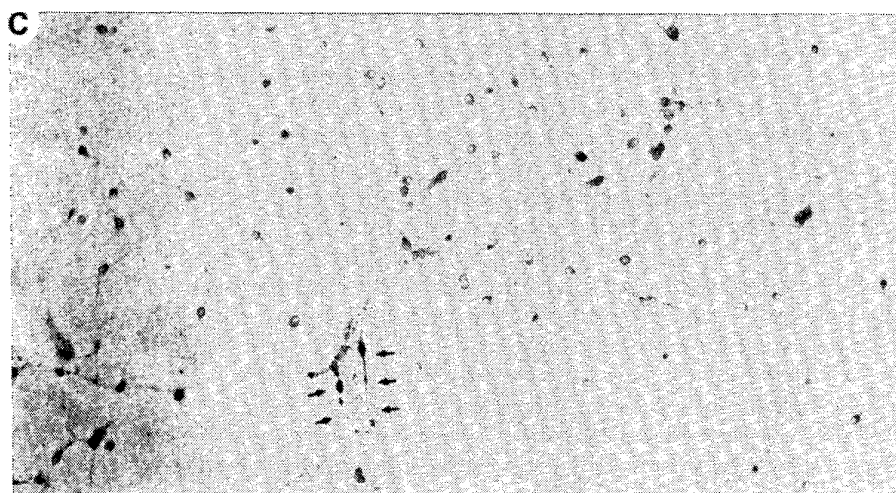
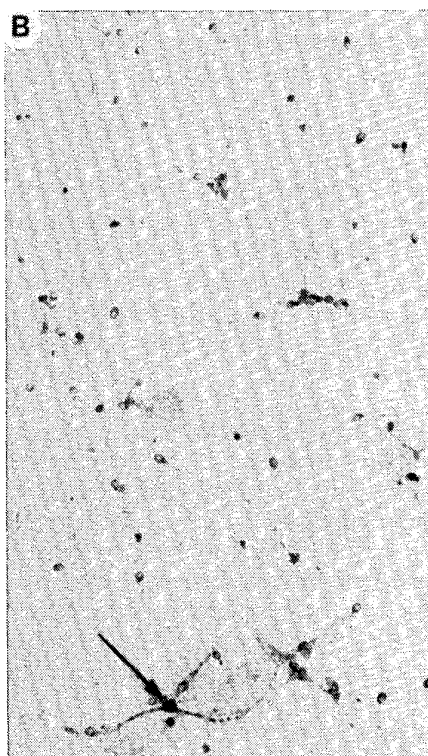


**FIG. 33C**

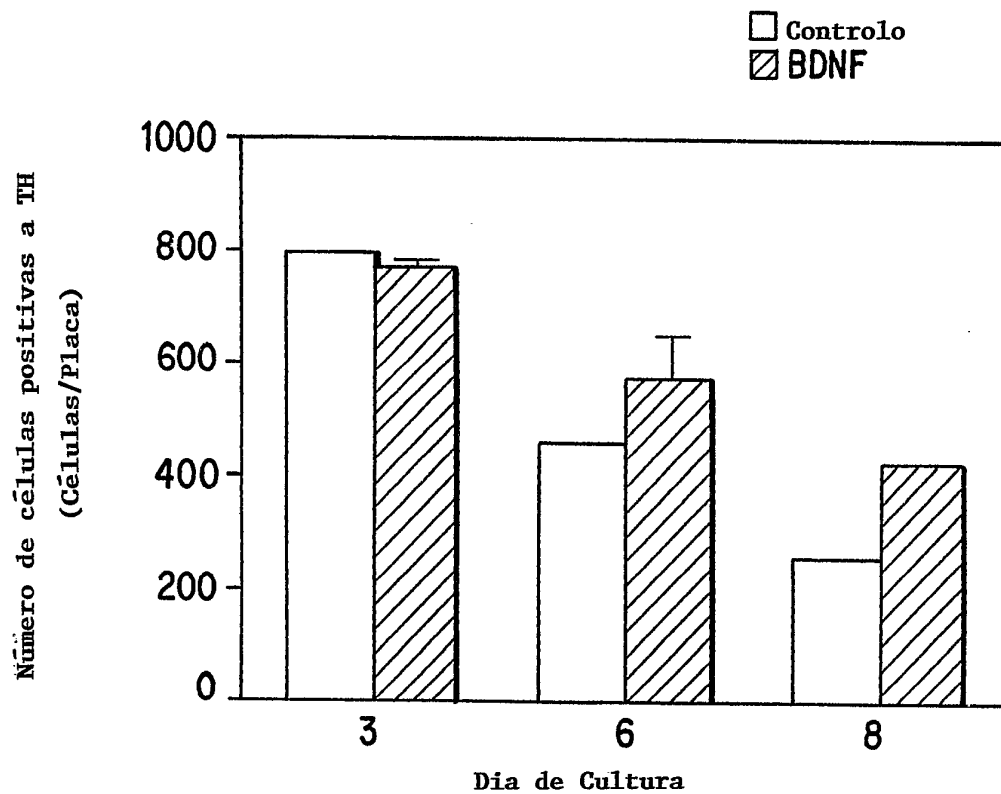


FIG. 34 A

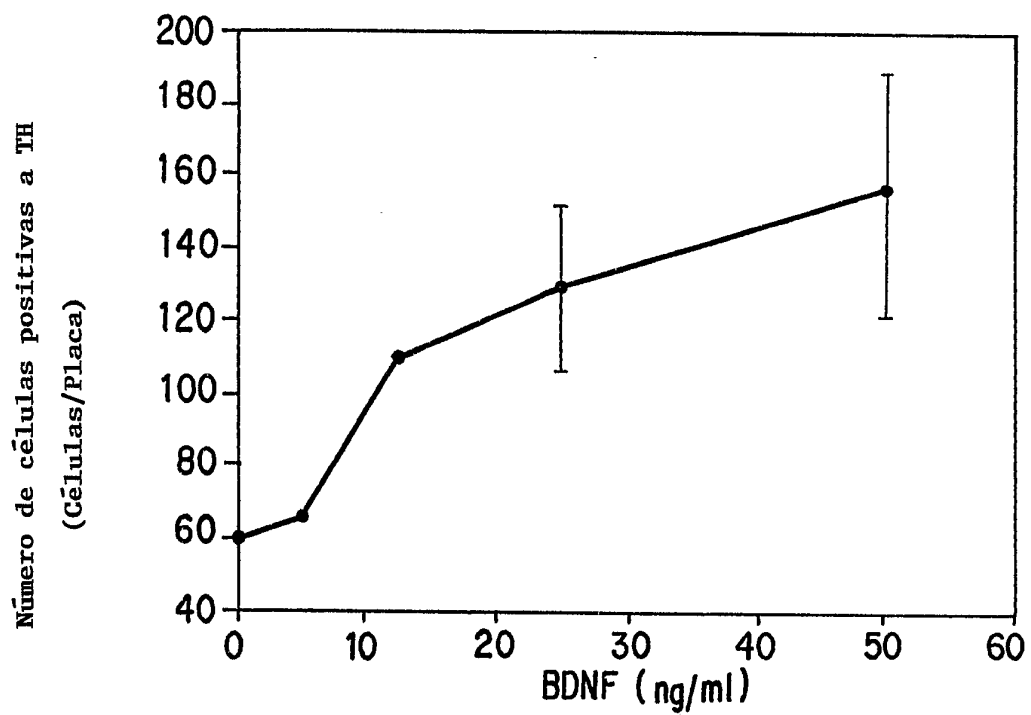


FIG. 34 B

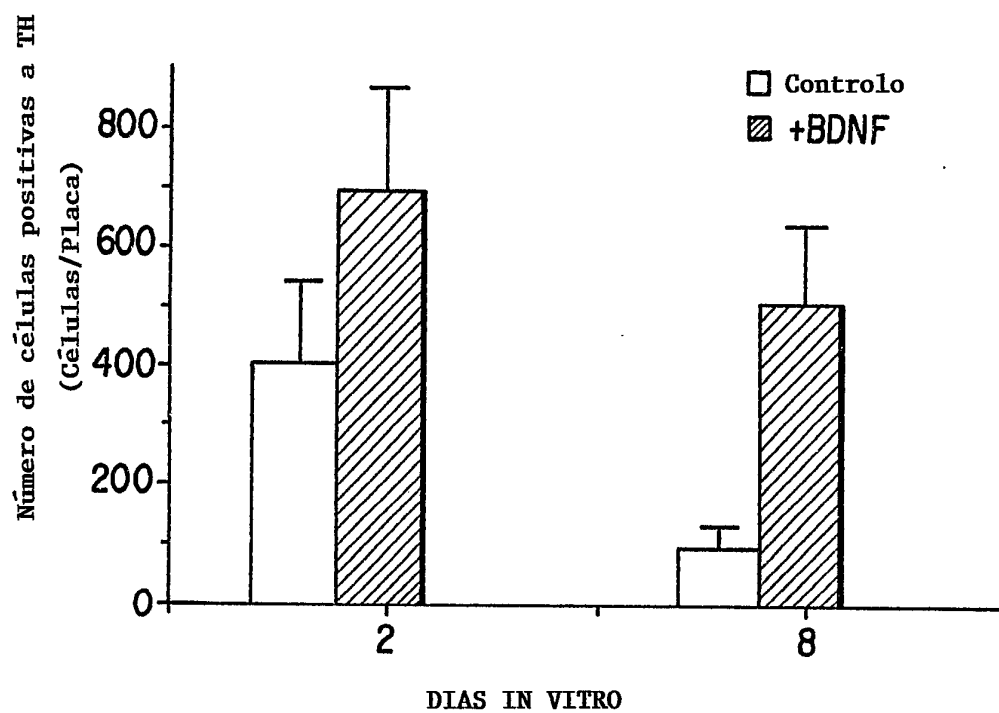


FIG. 35

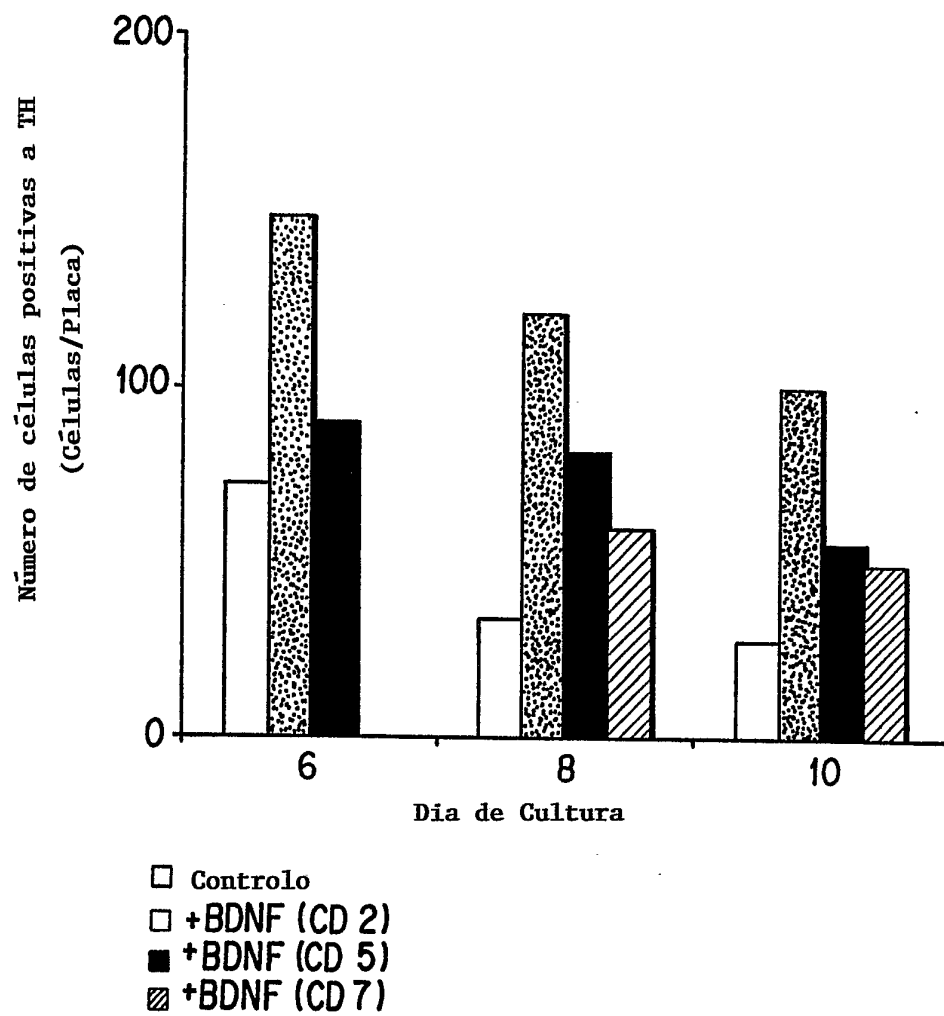


FIG. 36



Tomada específica  
de GABA  
(CPM/10min/poço )

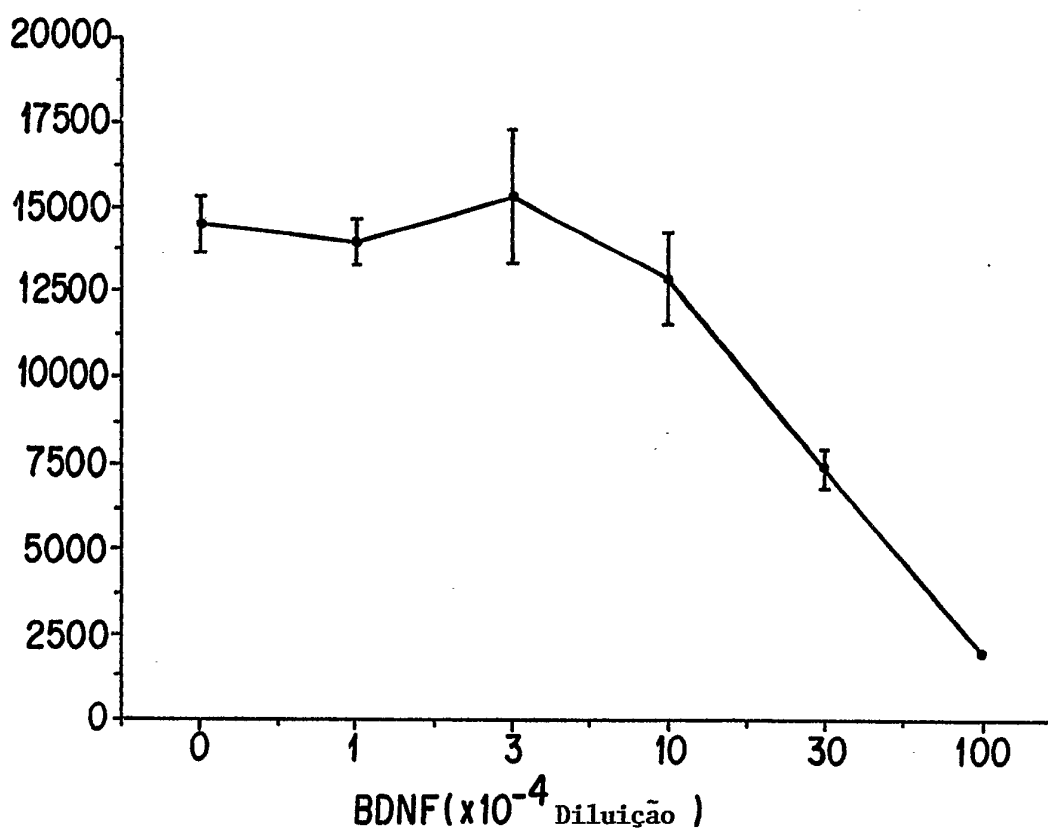


FIG. 37

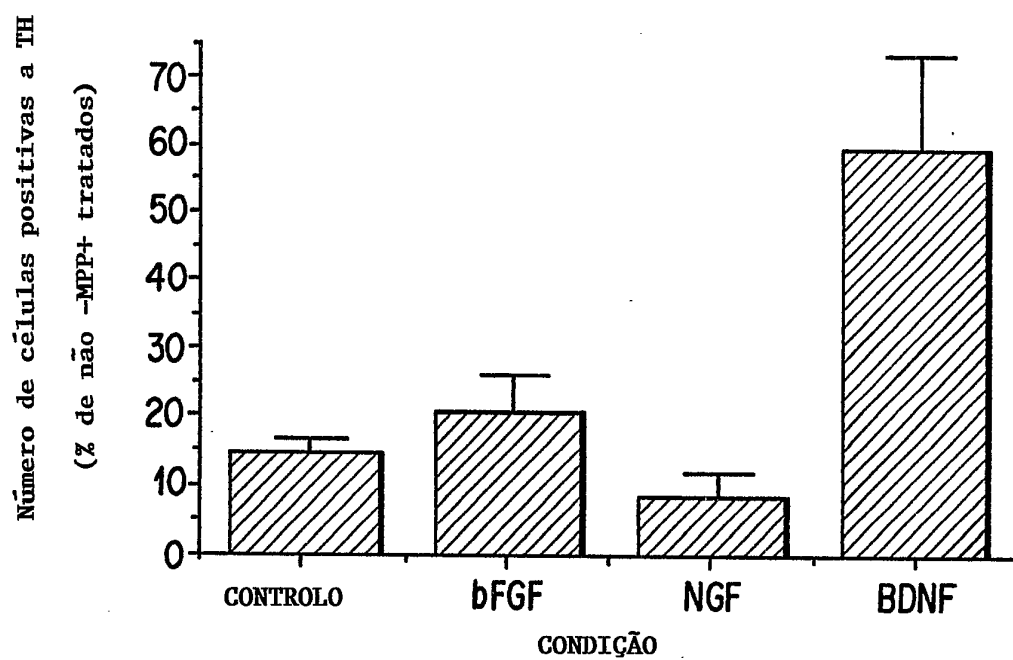


FIG. 38