

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Química e Bioquímica



ESTUDOS DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM rhHGF DE
CÉLULAS EPITELIAIS BRÔNQUICAS DERIVADAS DE DOENTES COM
FIBROSE QUÍSTICA: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES REGENERATIVAS
VERSUS ONCOGÉNICAS

Andreia Gomes Duarte

Dissertação orientada pelo Doutor Paulo Matos

VERSÃO PÚBLICA

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

Bioquímica Médica

Dissertação

2015

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Dr. Paulo Matos por me ter dado a conhecer a Ciência como ela é. Desde a oportunidade que me deu em integrar a sua equipa até tudo o que me ensinou. Não poderia deixar de realçar o seu sentido de humor aliado à sua experiência extrema...tive muita sorte!

Ao Dr. Peter Jordan, agradeço a forma como me recebeu, desde o primeiro dia. Além de constantemente interessado no que se passava com o meu trabalho nunca deixou de me alertar para pormenores e detalhes. O meu muito obrigado.

Não seria justo não referir quem apoiou todo meu trajeto ao longo deste ano. Assim sendo, obrigada à Patrícia, sempre com uma paciência incondicional para responder a todas as minhas perguntas (sei que foram muitas!), pelas horas disponibilizadas comigo e, acima de tudo, pela pessoa que é.

Tenho noção de que nem toda a gente irá ter (ou terá tido) a mesma sorte que eu com colegas como a Vânia, Andreia e Cláudia, que fizeram da Oncobiologia um local onde adorei passar este último ano. Ainda que sem exceções queria apenas deixar umas palavras mais dirigidas: à Joana, sempre disposta a ajudar, não esquecendo os seus ensinamentos, que me ficaram na cabeça desde o primeiro dia! À Ana, por todo o conhecimento partilhado numa área que desconhecia e por toda a ajuda prestada na obtenção dos meus resultados, do primeiro ao último dia.

Às minhas amigas Marta Reis, Mariana, Marta Palmeirim, Raquel, Liliana e Andreia por tantos momentos de amizade, diversão e apoio condicional – ainda que longe, estamos sempre perto! Neste núcleo, não quero deixar passar em branco outra amizade: Sílvia, obrigada por estes 15 anos, incluindo este último de noites no laboratório à espera de clonagens que teimavam em não funcionar! Sem dúvida que o meu percurso este ano teria sido muito menos divertido sem a tua companhia. Não menos importante à Luísa, por ser a pessoa mais interessada e dedicada que conheço e tenho a felicidade de ter na minha vida.

Aos meus pais, poucas palavras chegam para definir o que fizeram, fazem e continuam a fazer por mim. Obrigada pela educação que me deram, pelos esforços que ultrapassaram para que eu pudesse ter tudo e seguisse o que sempre quis. Espero ter-vos deixado orgulhosos! À minha irmã Joana, por tudo o que significa para mim, por todo o apoio que me deu mesmo sem fazer a mínima ideia do que faço num laboratório e por nunca ter deixado de me lembrar de que eu seria capaz.

Por último, não poderia deixar de agradecer ao Diogo: obrigada por toda a paciência, por todas as horas em que ouviste falar em PCRs, clonagens e epitélios e por nunca te cansares de dizer “tenho muito orgulho na minha cientista!”.

Cada um de vocês, à sua maneira, contribuiu para este trabalho e para o meu crescimento, não só como “pequena” cientista, mas como pessoa. O mínimo que poderei fazer é continuar este caminho, desejando aprender sempre mais, com a consciência de que foi um prazer partilhar estes momentos com estas pessoas.

*“Eles não sabem que o sonho
é uma constante da vida
tão concreta e definida
como outra coisa qualquer,*

(...)

*Eles não sabem, nem sonham,
que o sonho comanda a vida.
Que sempre que o homem sonha
o mundo pula e avança
como bola colorida
entre as mãos de uma criança.”*

António Gedeão, in “Pedra Filosofal”

Resumo

A Fibrose Quística (FQ) é uma doença genética letal com uma incidência diferencial consoante a origem dos indivíduos. Os Caucasianos continuam a ser a população mais afetada, com cerca de 70 000 doentes em todo o Mundo. Esta é uma doença monogénica, ou seja, causada por mutações que ocorrem num único gene – o gene CFTR (do inglês, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Este gene codifica para uma proteína que constitui um canal de cloreto (Cl⁻) presente na superfície apical das células epiteliais. Embora estejam descritas mais de 2000 mutações neste gene, que afetam a proteína CFTR de diversas formas, todas as mutações patogénicas culminam no mesmo resultado final - uma secreção deficiente de Cl⁻ no epitélio, conseqüente do défice funcional do canal CFTR. Este défice origina um desequilíbrio eletrolítico que provoca as manifestações associadas à FQ. Esta doença atinge vários órgãos e tecidos como o sistema gastrointestinal, reprodutor e aparelho respiratório (o mais afetado), estando a principal causa de morte da FQ associada à falência pulmonar.

A mutação mais frequente associada à FQ ocorre em pelo menos um alelo em 80-90% dos pacientes e é a F508del. A F508del consiste na deleção de um resíduo de fenilalanina na posição 508 da cadeia polipeptídica. Esta mutação provoca, em primeira instância, defeitos no processamento/*fold*ing da CFTR, impedindo que esta atinja a membrana plasmática (MP). Adicionalmente, as poucas moléculas CFTR-F508del que conseguem atingir a MP são dotadas de defeitos ao nível da abertura do canal (*gating*) bem como de um tempo de semi-vida na MP (estabilidade na MP) extremamente reduzido, quando comparado com a CFTR *wild type* (wt).

Atualmente existem compostos capazes de promover, *in vitro*, o resgate parcial do *fold*ing da CFTR e o seu tráfego para a MP (denominados “corretores”, como o VX-809) e a abertura do canal na MP (denominados “potenciadores”, como o VX-770). No entanto, em ensaios clínicos de fase II, o tratamento com o corretor VX-809 não originou alterações estatisticamente significativas na maturação da CFTR-F508del em doentes. Posteriormente, em ensaios de fase III onde se empregou um tratamento combinado com o corretor VX-809 e o potenciador VX-770, conseguiram-se melhorias pequenas mas estatisticamente significativas na função pulmonar de pacientes portadores da mutação F508del em homozigotia. Contudo, a combinação destes fármacos revelou efeitos indesejáveis, com o VX-770 a reverter a estabilização da CFTR-F508del promovida pelo VX-809. Estes dados abriram caminho a novas perspetivas na pesquisa de compostos terapêuticos, nomeadamente ao nível de combinações de fármacos capazes de corrigir os defeitos de *fold*ing, *gating* e estabilidade na MP associados à CFTR-F508del. Uma dessas abordagens terapêuticas visa a melhoria da retenção na MP da CFTR-F508del resgatada farmacologicamente.

A nível molecular sabe-se que a via Rac1, que pode ser ativada pelo fator crescimento de hepatócitos (HGF), promove a ancoragem da CFTR-F508del à MP e ao citoesqueleto de actina mediante a sua interação com duas proteínas adaptadoras, a Ezrina e o NHERF1. Apesar de documentadas as suas propriedades regenerativas em tecidos epiteliais de origens diversas, a pleiotropia funcional do HGF bem como a associação da sua sinalização ao desenvolvimento de certas neoplasias, poderá limitar a sua aplicabilidade terapêutica na FQ.

O principal objetivo do presente estudo foi pois realizar um conjunto de estudos preliminares *in vitro* para avaliar se as propriedades pró-regenerativas do fator HGF se sobrepunham ou não às suas propriedades pró-proliferativas, isto quando em conjunto e por comparação com os compostos VX-809 e VX-770. Para tal utilizaram-se culturas de células polarizadas de dois tipos celulares representativos de tecidos alvo destes tratamentos: células epiteliais brônquicas (uma linha celular derivada de um paciente FQ - CFBE) e do epitélio intestinal (uma linha celular de adenocarcinoma coloretal - Caco2).

Os nossos resultados evidenciam o potencial regenerativo do HGF na promoção da diferenciação epitelial, tanto em culturas de células respiratórias como de células coloretais, em detrimento de potenciais efeitos pró-tumorigénicos advindos da sua administração continuada.

Concluindo, estes resultados abrem portas a uma terapia combinada que adicione, aos corretores e potenciadores, um fator responsável por melhorar tanto a eficácia destes compostos como contribuir para a regeneração do epitélio respiratório dos doentes FQ.

Palavras-chave: Fibrose Quística; Ancoragem; Terapia Combinada; Ezrina; HGF.

Abstract

Cystic Fibrosis (CF) is a lethal genetic disease with Caucasians being the most affected population, with around 70 000 cases worldwide. This disease results from mutations in a single gene – CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). This gene encodes a Cl⁻ channel that is expressed at the apical membrane of epithelial cells. There are over 2000 CFTR mutations described in CF patients that interfere with different aspects of the channel metabolism. However, all these mutations lead to the same end result: an impaired secretion of Cl⁻ by epithelial cells. This causes an electrolyte imbalance that is responsible for the manifestations of CF. These affect several organs and tissues such as the gastrointestinal and reproductive system and also respiratory tract (the most affected), with respiratory failure being the main cause of death associated with CF.

The most common mutation in CF, which occurs in at least one allele in 80-90% of the patients, is F508del. The F508del consists in the deletion of a phenylalanine residue at position 508 of the polypeptide chain. This mutation causes, in first instance, defects in CFTR folding, and prevents most of it from reaching the plasma membrane (PM). Additionally, the few F508del-CFTR molecules which are somehow able to reach the PM also have defects in channel opening (gating) as well as an extremely short half-life at the PM (stability), compared with the wild type CFTR (wt).

Currently, there are compounds that can partially rescue the folding of CFTR and its trafficking to the MP (called "correctors", such as VX-809) and also the opening of the channel at the MP (called "potentiators", as VX-770). Treatment with the "corrector" VX-809 showed no statistically significant improvement in the maturation of F508del-CFTR in patients at phase II clinical trials. Subsequently, a combinatory treatment with VX-809 and the "potentiator" VX-770 showed a small but statistically significant improvement in lung function of patients homozygous for F508del mutation. However, the combination of these drugs has also revealed undesirable effects, with the VX-770 reversing the VX-809 stabilization of F508del-CFTR. These data highlighted the need for new therapeutic compounds and approaches, particularly in terms of combinations of drugs able to correct the folding, gating and cell surface stability defects associated with F508del-CFTR. A new approach was recently proposed to target the PM stability defect. At a molecular level, the Rac1 pathway, which can be activated by hepatocyte growth factor (HGF), promotes the retention of pharmacologically rescued F508del-CFTR at the PM and its anchoring to actin cytoskeleton, through its interaction with two adaptor proteins, Ezrin and NHERF1. However, despite its documented regenerative properties of epithelial tissues, the pleiotropy of HGF signalling and the association of its upregulation with

the progression of some malignancies may limit the therapeutic applicability of this factor in CF.

The main goal of this study was, thus, to evaluate what aspect of HGF's properties would prevail upon a prolonged exposure of epithelial cell polarized monolayers to this factor: the differentiative and regenerative or the pro-proliferative and tumorigenic. Moreover, these were evaluated together and in comparison to the prolonged administration of VX-809 and VX-770 in two representative cell types: a bronchial epithelial cell line derived from a CF patient (CFBE cells) and a cell line of intestinal origin derived from a colon adenocarcinoma (Caco2 cells).

Our results demonstrate the regenerative and pro-differentiative potential of HGF prolonged treatment prevails in both cell types, possibly compensating the pro-tumorigenic effects that may arise from its continued administration.

Therefore, these results open the way to a combined therapy which adds to the correctors and potentiators a factor capable of enhancing the efficacy of this compounds and also contribute to respiratory epithelia regeneration in CF patients.

Keywords: Cystic Fibrosis; Anchoring; Combined Therapy; Ezrin; HGF.