

Proposta para estágio de Mestrado

Supervisor: Ana Filipa Rodrigues

Contacto Supervisor: anafr@itqb.unl.pt

Lab/Instituição: Cell Line Development and Molecular Biotechnology, UTCA, iBET and ITQB NOVA

Av. da República (EAN), 2781-901 Oeiras. Web: <http://tca.itqb.unl.pt>

TÍTULO: Novas linhas celulares hepáticas para investigação, teste de fármacos e desenvolvimento de vacinas

INTRODUÇÃO

Os patogénios hepatotrópicos – aqueles que usam hepatócitos como célula hospedeira principal, secundária ou em alguma fase do seu ciclo de vida – representam graves ameaças de saúde e constituem pesados fardos sociais e económicos. Entre os patogénios hepatotrópicos que mais necessitam de soluções terapêuticas ou profiláticas eficientes destacam-se o vírus da hepatite C (HCV) e o plasmódio (malária).

Estes patogénios partilham uma característica em comum na medida em que, para além de *in vivo*, só se replicam eficazmente em hepatócitos humanos de cultura primária, isto é, acabados de isolar do fígado. Após o isolamento, os hepatócitos perdem rapidamente as suas características mais relevantes, muitas vezes tornando-se refractários à infecção por estes microorganismos. Sistemas alternativos de cultura *in vitro*, incluindo várias linhas celulares hepáticas humanas, não apresentam o fenótipo característico de hepatócitos primários (acabados de isolar), não proporcionando um ambiente adequado que permita recapitular o seu ciclo de vida. Esta limitação traduz-se na falta de modelos celulares relevantes e robustos na investigação e desenvolvimentos de fármacos ou vacinas para o tratamento ou prevenção de patogénios hepatotópicos.

OBJECTIVO

Este projecto tem como objectivo desenvolver novas linhas celulares humanas com as características semelhantes a hepatócitos de cultura primária, como modelos relevantes e fidedignos para teste de fármacos e desenvolvimento de vacinas contra patogénios hepatotrópicos. Estas células serão desenvolvidas a partir de culturas primárias que serão imortalizadas e geneticamente manipuladas para exibirem as características fenotípicas das culturas primárias.

DESCRIÇÃO DO PROJECTO

Hepatócitos humanos – isolados a partir de biópsias de fígado de pacientes sujeitos a hepatectomia parcial – serão imortalizados com um painel de genes virais e celulares. Para além dos genes de imortalização serão também manipulados (sobre-expressão ou knock-out) genes especificamente associados ao fenótipo de hepatócito humano. Estas manipulações e entrega de genes imortalizantes

(descrição do projectos, continuação)

serão feitas com recurso a vectores lentivirais. As diferentes células (resultantes das diferentes estratégias de imortalização combinadas com diferentes manipulações genéticas) serão caracterizadas para avaliar o fenótipo final resultante e comparadas com hepatócitos humanos (de cultura primária) com recurso a várias técnicas (imunohistoquímica, RT-qPCR, *next generation sequencing*, testes bioquímicos de funcionalidade, etc.).

As células que mais fielmente se assemelharem a hepatócitos humanos serão avaliadas como hospedeiros de replicação de HCV, que constitui actualmente o *gold-standard* da verificação do fenótipo hepático primário e da capacidade de replicação de outros patogénios hepatotrópicos. Estas células serão comparadas com as linhas celulares hepáticas existentes e avaliadas como modelo de estudo mais relevante, nomeadamente em testes de fármacos contra o HCV e/ou ensaios de neutralização. A sua utilização para estudo e replicação de outros patogénios hepatotrópicos está igualmente prevista (sujeita a disponibilidade de tempo e do bom andamento dos trabalhos).

Tarefa 1 – Aprendizagem de técnicas de cultura de células animais: trabalhar em condições de esterilidade numa câmara de fluxo laminar, propagação de células, contagem de células, congelamento de células. Leitura de bibliografia.

Tarefa 2 – Aprendizagem de técnicas de biologia molecular; clonagem, produção de plasmídeos, produção dos vectores lentivirais de imortalização e manipulação genética, transfecção de células animais, análise de células por citometria de fluxo, RT-qPCR.

Tarefa 3 – Aprendizagem de técnicas para estabelecimento de culturas primárias de hepatócitos humanos (isolamento a partir de tecido); imortalização dos hepatócitos e sua manipulação genética; caracterização das células imortalizadas (imunohistoquímica, citometria de fluxo, microscopia de fluorescência, RT-qPCR, *next generation sequencing*, etc).

Tarefa 4 – Produção de vírus da hepatite C, electroporação de células animais, análise e quantificação de HCV.

Tarefa 5 – Avaliação da replicação de HCV nas novas linhas celulares; teste de fármacos inibidores; ensaios de neutralização (desenvolvimento de vacinas).

Tese – Escrita da tese de Mestrado.

Planeamento

	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	Mês 7	Mês 8	Mês 9	Mês 10	Mês 11	Mês 12
Tarefa 1												
Tarefa 2												
Tarefa 3												
Tarefa 4												
Tarefa 5												
Tese												