

Plano de Estágio de Mestrado

Tema: *Produção de partículas semelhantes a retrovírus como candidatos a vacinas para a Hepatite C*

Orientador: Doutora Ana Sofia Coroadinha (avalente@itqb.unl.pt)

Local: Unidade de Tecnologia de Células Animais - ITQB/IBET (Av. da República (EAN), 2781-901 Oeiras). Web: [//tca.itqb.unl.pt](http://tca.itqb.unl.pt)

Resumo:

As infecções com o vírus da Hepatite C (HCV) afectam 170 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO). Parte dos indivíduos infectados desenvolvem Hepatite C crónica, que posteriormente pode levar ao aparecimento de cirroses e cancro do fígado. Actualmente, não existe vacina contra o HCV e a terapia convencional para o tratamento de infecções crónicas por HCV consiste na administração de interferão combinado com ribavirina. No entanto, este tratamento é apenas eficaz em 50 % dos pacientes, é moroso, dispendioso e induz diversos efeitos secundários. Face à elevada ocorrência de infecções por HCV e a possibilidade de esta poder originar graves danos nos pacientes (como cirrose), o desenvolvimento de uma vacina para a Hepatite C será de elevada relevância.

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento da comercialização de vacinas constituídas por partículas semelhantes a vírus (VLPs), como é o caso da vacina para a Hepatite B e, mais recentemente, a vacina contra o Vírus do Papiloma Humano. Uma vez que as VLPs não contêm material genético, a sua utilização para vacinação de indivíduos saudáveis apresenta menos riscos associados do que a utilização de vacinas baseadas em vírus atenuados ou inactivados. Por outro lado, a disposição organizada e tridimensional de antígenos nas VLPs, mimetizam a estrutura dos vírus nativos, originando respostas imunológicas mais eficazes que a apresentação dos antígenos isolados [1].

Diversos vírus têm sido explorados para o desenvolvimento de VLPs [2], os retrovírus apresentam várias características vantajosas para o desenvolvimento de vacinas, destacando-se a sua reduzida imunogenicidade, e a capacidade de incorporar proteínas de envelope de vírus heterólogos.

Este mestrado enquadra-se num projecto para desenvolver e avaliar o potencial das partículas semelhantes a retrovírus (retrovLPs) candidatas a vacinas para a Hepatite C utilizando diferentes antígenos de HCV.

Está descrito que os retrovírus incorporam proteínas das células hospedeiro, quer internamente quer à superfície [3,4]. Algumas destas proteínas incorporadas na superfície viral originam respostas imunológicas. Em particular, as tetraspaninas CD81 e CD63 existentes nas células humanas produtoras de retroVLPs. Deste modo torna-se importante avaliar o efeito imunogénico inespecífico destas proteínas nas retroVLP e a possibilidade da sua remoção. Os retrovírus são geralmente produzidos em células humanas (HEK293) [5]. Neste trabalho será comparado o perfil imunológico de retroVLPs produzidas em células humanas (HEK293) com e sem silenciamento das tetraspaninas CD81 e CD63. Será adicionalmente avaliado o potencial imunológico de retroVLPs produzidas por células não-humanas, nomeadamente as NIH3T3 (ratinho) e Sf9 (insecto).

Este estágio de mestrado visa a criação de linhas celulares produtoras de retroVLPs com apresentação dos epitopos E1 e E2 (retrovLP-E1/E2), utilizando para tal os genes *gag-pol* do “Moloney murine leukemia virus” (MLV) para a formação da VLP. O trabalho desenvolvido contribuirá não só para o desenvolvimento de vacinas para hepatite C como para elucidar o potencial das retroVLPs o que permitirá alargar a sua utilização em vacinação.

Este trabalho enquadra-se no âmbito do projecto FCT (retrovLP-PTDC/EBB-BIO/102649/2008).

Metodologias: Cultura de células animais, manipulação de vectores retrovirais e baculovírus, real-time RT-PCR, RNAi, Western-blot, purificação de vectores virais, citometria de fluxo, biologia molecular, analíticos vários.

1. Bellier, B., et al., *DNA vaccines expressing retrovirus-like particles are efficient immunogens to induce neutralizing antibodies*. Vaccine, 2009. 27(42): p. 5772-80.
2. Noad, R. and P. Roy, *Virus-like particles as immunogens*. Trends Microbiol, 2003. 11(9): p. 438-44.
3. Ott, D.E., *Cellular proteins in HIV virions*. Rev Med Virol, 1997. 7(3): p. 167-180.
4. Segura, M.M., et al., *Identification of host proteins associated with retroviral vector particles by proteomic analysis of highly purified vector preparations*. J Virol, 2008. 82(3): p. 1107-17.
5. Carrondo, M.J.T et al. *Impact of retroviral vector components Stoichiometry on packaging cell lines: effects on productivity and vector quality*. Hum. Gene Ther., 2008, 19(2):199-210

Plano detalhado:

Fase I - Aprendizagem das técnicas de manipulação de células animais: trabalho em esterilidade, propagação de células, contagem de células, congelamento e descongelamento de células. Leitura bibliográfica sobre o trabalho.

Fase II - Aprendizagem das técnicas específicas à manipulação de vectores retrovirais: cultura de células produtoras de retrovírus em *t-flask* (cultura em monocamada), quantificação de partículas retrovirais totais e infecciosas. Caracterização do crescimento celular e produtividade viral. Análise do metabolismo energético primário das células pelo consumo de glucose e glutamina e produção dos respectivos metabolitos.

Fase III: Aprendizagem das técnicas específicas de biologia molecular e construção de vectores de expressão. Transfecção de células ou desenvolvimento de sistemas para siRNA. Transfecção de células HEK293 e NIH3T3 e infecção de Sf9 com baculovírus.

Fase VI – Caracterização e comparação de várias linhas celulares desenvolvidas: taxas específicas de crescimento, produtividade viral, avaliação da incorporação dos epítomos do HCV e do silenciamento de proteínas celulares. Purificação e caraterização das retroVLPs produzidas nos vários sistemas.

Fase V – Elaboração da Tese de Mestrado.

Duração do estágio: 1 ano a tempo inteiro.

Planeamento das Fases de Estágio

	Mês											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fase I												
Fase II												
Fase III												
Fase IV												
Fase V												

Número de estagiários: 1