

Área Científica **Microbiologia e Patologia Animal**

Código EXPL/CVT-EPI/0360/2013 **Início** 2014/3/1 **Termo** 2015/05/31
Título Vacinas de DNA contendo a subunidade hemaglutinina do vírus da gripe aviária e sequências de direcionamento para uso num contexto DIVA

Programa FCT **Medida** Projetos Exploratórios de IC&DT em todos os Domínios Científicos

Instituição Líder Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Investigador Responsável INIAV Ana Margarida Ferreira Henriques Oliveira Mourão

Orçamento Total 49 947,00€

Orçamento INIAV 36 747,00€

Parceria

INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.	Nacional
IST	Instituto Superior Técnico	Nacional

Equipa

Ana Margarida Ferreira Henriques Oliveira Mourão
Miguel Agostinho Sousa Pinto Torres Fevereiro
Teresa Maria Martins Fagulha
Maria Margarida Nunes da Rosa Dias Duarte
Fernanda Maria Rodrigues Ramos
Tiago Miguel Baeta Luís
Sílvia Carla Santos de Barros
Rita Francisco Marques

Resumo

Os vírus da influenza aviária (AIV) são agentes patogênicos importantes para a saúde humana e animal, responsáveis por elevados níveis de morbidade e mortalidade em todo o mundo [RB1]. Além disso, a possibilidade destes vírus atravessarem a barreira da espécie para os humanos é de grande preocupação. Estes vírus podem ser classificados em subtipos com base em diferenças nos epitópos da hemaglutinina (HA) e da neuraminidase (NA), as principais glicoproteínas da superfície do virião. Nas aves domésticas, o AIV de alta patogenicidade (HPAI) está limitado aos subtipos H5 e H7 [RB2]. Atualmente são necessárias medidas que visem o controle da infecção pelo AIV. Têm sido utilizados vírus inativados para a vacinação de aves. Contudo, a imunização com vacinas inativadas homólogas interfere com a monitorização sorológica, uma vez que não é possível distinguir os animais vacinados dos naturalmente infetados. Este projeto propõe o desenvolvimento de vacinas de DNA contra o AIV. Numa vacina de DNA, o agente imune consiste num gene que é clonado num plasmídeo, sendo o antigénio sintetizado no interior do hospedeiro. Uma vez sintetizado, o antigénio é apresentado ao sistema imune, originando resposta e memória imunológicas que irão proteger o organismo da doença. Esta tecnologia oferece diversas vantagens, principalmente o desenvolvimento de imunidade celular por ativação das vias MHC I e II devido à síntese do antigénio ocorrer no interior das células do organismo vacinado. Além disso, o desenvolvimento, produção, armazenamento e transporte da vacina de DNA são simples e de baixo custo. No caso desta proposta, tem a vantagem adicional de poder ser usada como uma estratégia DIVA para diferenciar os animais infetados dos vacinados. Os anticorpos produzidos contra a proteína HA proporcionam a proteção primária contra o AIV sendo possível proteger animais vacinando apenas com esta proteína [RB3]. Assim, propomos o desenvolvimento de vacinas de DNA, através da clonagem num vector de expressão das regiões codificantes H5 e H7 de estirpes de baixa patogenicidade isoladas no nosso laboratório. A imunização com estas proteínas dará proteção cruzada contra HPAI do mesmo subtipo. A vacinação com uma ou a outra vacina vai depender da estirpe que se encontra em circulação. Ambas as vacinas podem ser adicionadas simultaneamente de modo a proteger dos dois subtipos. Alternativamente, vai ser testada uma vacina de DNA multivalente, com os dois subtipos HA clonados no mesmo vector. Esta constitui uma vacina de subunidades que pode ser utilizada num contexto DIVA (diferenciação entre animais infetados e vacinados), uma vez que a deteção de anticorpos contra outra proteína que não a HA revela a presença de uma infecção pelo AIV. As vacinas de DNA são muito mais eficientes quando administradas com adjuvantes, o que torna o processo de vacinação muito caro. Nós pretendemos eliminar a necessidade de utilização de adjuvantes e reduzir os custos associados através da clonagem de sequências de direcionamento, tal como o nosso grupo fez anteriormente. Estas sequências promovem o direcionamento da proteína expressa para compartimentos onde pode ser mais facilmente apresentada ao sistema imunitário. Devido a limitações de tempo, propomos a utilização das sequências de direcionamento mais promissoras num estudo em curso com a neuraminidase do AIV e o sinal de excreção (Sc), a proteína LAMP que direciona para os lisossomas e o sinal E1A que dirige a proteína para o retículo endoplasmático. Como já foi referido, as vacinas de DNA serão construídas através da clonagem das regiões codificantes das proteínas H5 e H7 num vector de expressão. Os plasmídeos obtidos serão testados *in vitro* através da transfeção de células animais, de modo a verificar os níveis de expressão das proteínas. Os ensaios de vacinação serão efetuados por imunização de galinhas. De modo a testar a eficiência das vacinas de DNA na ativação do sistema imune, ambas as respostas humoral e celular serão avaliadas. Serão ainda testadas estratégias de prime-boost e a utilização de veículos de transporte [PA1]. Por último, deverá ser efetuado um desafio de vírus. Este projeto irá combinar conhecimentos adquiridos em trabalhos anteriores. Desenvolvemos já vacinas de DNA promissoras contra o MVV [PA2], a Tripanossomíase [PA3] e AI (não publicado). O nosso grupo desenvolveu também um método de produção de plasmídeo puro com elevado rendimento para utilização como biofármaco [RB4]. O desenvolvimento de vacinas de DNA proposto neste projeto oferece a vantagem de adquirir vacinas inovadoras contra o AIV contendo sequências de direcionamento que podem ser aplicadas em qualquer surto num contexto DIVA para o controle e erradicação de AI. Este projeto vai permitir o desenvolvimento de uma tecnologia inovadora, estimulando as capacidades técnicas e científicas dos laboratórios envolvidos e incentivar a produção nacional de vacinas, tornando o país menos dependente das importações.