

Doutorado

3/1/2021

Paulo Costa Carvalho

Toward personalized skin health with mass spectrometry and artificial intelligence

---

Skin is one of the first and foremost barriers of protection from the outside world, playing a central role in immunological defense through its several distinct layers. In aging, skin cells are progressively damaged, affecting their organization and repair capacity. As the world population ages, next-generation skincare approaches become increasingly in demand. Our project will provide four novel contributions: A) a non-invasive proteomic skin sampling approach. B) Generate a proteomic database that reflects human skin aging and responses to cosmetics of interest (Ethics committee review board CAAE:38352020.8.0000.5248) C) Application of our artificial intelligence system developed, DiagnoProt, to learn the proteomic skin patterns from the various ages and serve as the basis for a general-purpose skin health evaluation procedure D) Shortlist key protein alterations related to skin aging and in response to bioactives of interest. Scientific pieces of evidence suggest that biological aging processes are, to some extent, reversible. By the end of this project, we will present a disruptive and end-to-end solution for pinning down molecular processes related to aging and evaluating bioactive ingredients that can impact skin health. Our approach should serve for immediate and wide adoption as a reliable scientific solution for evaluating and developing new bioingredients and thus marks a step forward in skin health science.

---

Doutorado

3/3/2022

Orientador: Bruno Dallagiovanna | Coorientadora: Alessandra Melo de Aguiar

Caracterização do tradutoma e do secretoma de células-tronco pluripotentes humanas induzidas durante a diferenciação em hepatócitos

O fígado é responsável por uma ampla gama de processos metabólicos, sendo considerado um dos principais reguladores da homeostase fisiológica corporal. Apesar disso, a falta de modelos *in vitro* que reproduzam de maneira acurada as funcionalidades do fígado limitam o avanço de novos estudos acerca da função e metabolismo hepático. As células-tronco pluripotentes humanas induzidas (iPSCs) são um modelo promissor para estudo do processo de diferenciação hepática, uma vez que são uma fonte autóloga ilimitada de células humanas. Entretanto, a maturação terminal de hepatócitos gerados de iPSCs ainda não foi alcançada. Assim, este projeto tem como objetivo caracterizar o tradutoma e o secretoma de iPSCs durante a diferenciação hepática e comparar com hepatócitos primários e linhagens celulares hepáticas. Para isso, iPSCs foram diferenciadas por 28 dias e a expressão de marcadores de hepatócitos foi avaliada por citometria de fluxo, imunofluorescência e qPCR em diferentes estágios da diferenciação. No quinto dia de diferenciação (D4), a caracterização por citometria de fluxo demonstrou  $86,97 \pm 1,76\%$  de células positivas para marcadores de superfície de endoderme (CD117 e CD184), indicando a transição das iPSCs para este folheto. Além disso, as iPSCs exibiram aumento na expressão de SOX17, confirmando assim a formação da endoderme. No estágio de especificação hepática (D4 – D10), as células assumiram morfologia cuboidal de hepatoblastos e, em D10, a expressão de marcadores de hepatócitos (AFP, ALB, HNF4- $\alpha$  e CK19) foi detectada por imunofluorescência. Em conjunto, observou-se aumento na expressão de HNF4- $\alpha$  e ASGPR1 por qPCR, sendo ambos os genes relacionados ao fenótipo de hepatócitos. Em etapas futuras, hepatócitos gerados na etapa de maturação terminal (D28) serão caracterizados por ensaios funcionais e moleculares. Posteriormente, o perfil polissomal seguido por RNA-seq e obtenção do meio condicionado em D10 e D28 serão empregados avaliação do tradutoma e secretoma durante a diferenciação hepática.

Doutorado

3/1/2021

Andrea Avila

Criação, Desenvolvimento e Validação de Metodologia de Prospecção Tecnológica apropriada ao Instituto Carlos Chagas ICC/Fiocruz

A prospecção tecnológica pode possibilitar intervenções planejadas nos projetos de pesquisa, a partir de metodologias que identifiquem oportunidades e necessidades. O ICC, como unidade técnico-científica da Fiocruz, vem avançando em ações que busquem cobrir gargalos no processo de inovação. Assim, a hipótese do presente projeto é saber se é possível desenvolver padrões de metodologia de prospecção tecnológica que sejam apropriados aos projetos de pesquisa e desenvolvimento do ICC, contribuindo assim para o avanço na cadeia de inovação tecnológica das pesquisas realizadas na unidade. O projeto de doutorado foi dividido em cinco objetivos específicos: que vão desde avaliar a identidade de pesquisa do ICC, passando pela identificação das fontes principais de coleta de dados e pelo desenvolvimento de habilidades em software específicos para interpretação e modelagem desses dados científicos e tecnológicos, chegando-se então, a dois exercícios práticos para testar hipóteses e construir padrões metodológicos para a implantação da prospecção tecnológica no ICC. Nossos resultados indicam que a maioria dos projetos da unidade estão em um grupo de pesquisas essencialmente básicas e com maturidade tecnológica inicial. Foram identificadas as principais fontes de informação científica e tecnológica, levando em conta a identidade da unidade e verificada em especial a importância da fonte de estudos clínicos no processo de inovação. A revisão bibliográfica em artigos científicos, buscando metodologias de prospecção tecnológica para cada fonte de informação identificou elementos de análise de busca e de análise de dados quantitativos e qualitativos, assim como formas diversas de priorização de documentos e usos de software para estruturação dos dados coletados. O aprendizado adquirido está sendo aplicado em dois exercícios prospectivos, um deles em conjunto com a Universidade Federal de Viçosa, privilegiando a troca de experiências no tema.

Doutorado

9/1/2021

GUILHERME FERREIRA SILVEIRA / ALESSANDRA MELO DE AGUIAR (principal)

SAEDC - DESENVOLVIMENTO DE SOLUÇÃO TECNOLÓGICA PARA ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS E ESTATÍSTICA EM CITOTOXICIDADE

A metade da concentração inibitória máxima (IC50) e a metade da dose letal máxima (LD50) são as métricas mais amplamente utilizadas e informativas na avaliação de segurança de substâncias, principalmente no desenvolvimento de drogas. Dados gerados em ensaios in vitro são analisados segundo curva dose-resposta sigmoide com 4 parâmetros (função Hill). Este processo laborioso requer a utilização de múltiplos softwares, aumentando a chance de erros acidentais que podem comprometer os resultados. Assim, este projeto pretende desenvolver uma aplicação web para análise de dados de ensaios de toxicidade in vitro, buscando atender à plataforma RPT11J (ICC-Fiocruz/PR) e outros grupos. Para avaliar sua exequibilidade, um script em linguagem de programação python foi desenvolvido. Dados obtidos previamente pela RPT11J foram utilizados para validação do script e sua performance foi comparada com o programa GraphPad Prism, pelas métricas Top, LogIC50, IC50, LD50 e r-squared da função Hill corrigida. Não foi observada diferença estatística entre o script e GraphPad Prism: Top ( $p=0.7925$ ), LogIC50 ( $p=0.9989$ ), IC50 ( $p=0.7789$ ), LD50 ( $p=0.6772$ ) e r-squared ( $p=0.8661$ ). Posteriormente, um novo protótipo foi desenvolvido, utilizando ferramentas de desenvolvimento web (Apache HTTP Server Project, PHP, MySQL, phpMyAdmin, Docker, Jenkins e servidor DigitalOcean). Desta forma, a aplicação está hospedada em um servidor web e pode ser acessada em qualquer máquina com acesso à internet. Melhorias na aplicação serão feitas constantemente, com auxílio de testagens com usuários para identificação de erros e novas implementações. As testagens foram iniciadas com 1 usuário, para definição dos parâmetros mínimos da aplicação e estão em etapa de validação com usuários da plataforma RPT11J (2 usuários). As próximas etapas de testagens estão planejadas para englobar pesquisadores do ICC-Fiocruz/PR, e, posteriormente, os 48 laboratórios associados à rede RENAMA. Como perspectiva, pretende-se desenvolver uma aplicação web de análise de dados de citotoxicidade, com a geração de propriedade intelectual para o ICC-Fiocruz/PR.

Doutorado

8/1/2020

Nilson Ivo Tonin Zanchin

Desenvolvimento de ensaios de captura de antígeno de SARS-CoV-2 baseados em anticorpos recombinantes

A COVID-19 causada pelo novo coronavírus, SARS-CoV-2 causou milhares de mortes e sobrecarregou os sistemas de saúde. Atualmente, apesar de ter havido uma redução na taxa de mortalidade e gravidade da doença, a emergência de variantes de alta transmissibilidade, mostram que, ainda é essencial conter a transmissão para retardar a propagação de novas variantes. Três tipos de teste de diagnóstico

tiveram um importante papel na detecção da infecção por SARS-CoV-2, testes moleculares, cujo RT-PCR é o padrão ouro, testes de captura de antígenos e testes sorológicos. Destes, somente os dois primeiros são capazes de detectar a infecção ativa. Testes de captura de antígeno, por serem facilmente distribuídos e manipulados, ter menor custo e maior rapidez na obtenção dos resultados, são uma importante ferramenta de saúde pública para vigilância e controle da pandemia. Diante disso, é importante investir no estabelecimento de processos de produção de

insumos com tecnologia nacional para compor testes rápidos para diagnóstico de infecções ativas e que possam ser reproduzidos em larga escala. Para garantir a sensibilidade adequada dos testes, se faz necessária a produção de anticorpos de alta especificidade ao alvo e moléculas reveladoras mais sensíveis. A maioria dos testes de diagnóstico atuais utilizam a peroxidase de rábano (HRP) para revelação do teste, no entanto, há moléculas mais estáveis termicamente e mais fáceis de serem produzidas em sistemas de baixo custo, como a segunda geração da peroxidase de soja (APEX2) e as nanoenzimas, que são nanopartículas que mimetizam a atividade catalítica das peroxidases, como as nanopartículas de ouro ou magnéticas. As demandas derivadas da pandemia de COVID-19 levaram à produção de uma avalanche de anticorpos contra alvos de SARS-CoV-2 sem restrição de uso por propriedade intelectual e com potencial para serem produzidos de forma recombinante. Além disso, para uso em testes de diagnóstico não é necessário produzir de forma recombinante os anticorpos completos, sendo os fragmentos de anticorpos do tipo VHH e Fab mais apropriados para produção em sistemas recombinantes de baixo custo. Com base nisso, o objetivo deste projeto é produzir de forma recombinante e testar a eficiência dos VHHs Sb15, Sb68 e Ty1 acoplados à peroxidase APEX2

Doutorado

2/26/2021

Guilherme Ferreira Silveir

Análise de algoritmos de aprendizado de máquina na quantificação do número de células em imagens de microscopia de Contraste Digital

High Content Screening (HCS) combina técnicas de alto rendimento com a capacidade de gerar imagens celulares de sistemas biológicos complexos. Este trabalho tem como objetivo avaliar o desempenho de modelos preditivos utilizando Redes Neurais Convolucionais para identificar o número de células presentes em imagens de microscopia de contraste digital obtidas pelo equipamento HCS, uma vez que esta técnica é amplamente utilizada para este fim. Uma forma de avaliar o algoritmo foi através da métrica Mean Squared Error (MSE). O MSE foi de 4.335,99 na linhagem celular A549, 25.295,23 na linhagem celular Huh7 e 36.897,03 na linhagem celular 3T3. Após a obtenção desses valores, diferentes parâmetros dos modelos foram alterados para verificar como eles se comportam. Ao reduzir o número de imagens, o MSE aumentou consideravelmente, com a linha celular A549 mudando para 49.973,52, Huh7 para 79.473,88 e 3T3 para 52.977,05. Após testar os algoritmos, realizamos análises de correlação para os melhores e piores modelos. Na linhagem A549, o melhor modelo apresentou forte correlação positiva com  $R = 0,953$ . No Huh7, a melhor correlação do modelo foi  $R = 0,821$ , também uma forte correlação positiva. No 3T3, os modelos não apresentaram correlação, tendo o melhor modelo  $R = 0,100$ . Os modelos tiveram um bom desempenho na quantificação do número de células, e o número e a qualidade das imagens interferiram nessa capacidade preditiva.

Sepse é uma doença grave de importância global que afeta grande parte da população, tendo a bactéria *Staphylococcus aureus* como um dos principais patógenos. O diagnóstico laboratorial de bacteremia é importante para conduzir o clínico à correta implementação da antibioticoterapia. Contudo, o diagnóstico padrão ouro atual é feito a partir do cultivo microbiano que requer um tempo elevado para a obtenção do resultado definitivo. Consequente, o desenvolvimento de diagnóstico rápido, sensível, específico e acessível de bacteremias é extremamente importante na prática clínica. Neste contexto, sistemas diagnóstico baseados no sistema CRISPR fornecem resultados altamente específicos e sensíveis equiparáveis ou superiores a métodos de diagnóstico baseado em ácidos nucleicos disponíveis atualmente, com resultados entre 20 a 90 minutos. Desta forma, o presente projeto tem como objetivo o desenvolvimento de um diagnóstico baseado em CRISPR-Cas13a para a detecção de MSSA e MRSA em amostras simulando o estado de bacteremia. Para isso, serão identificados genes únicos aos isolados de *S. aureus* que poderão ser utilizados como alvo para a detecção com o sistema CRISPR. A endonuclease Cas13a será obtida através da indução da expressão com IPTG e purificação em bactéria transformada com um plasmídeo contendo a sequência derivada de *Leptotrichia buccalis* (LbuCas13a). Após a confirmação da atividade RNase da LbuCas13a in vitro, serão realizados ensaios de detecção de MSSA e MRSA, além de outras bactérias de importância na sepse, utilizando DNA genômico (gDNA) destes agentes. Posteriormente, a amplificação do gDNA feita por PCR será substituída por amplificação isotérmica. Finalmente, será determinada a sensibilidade e especificidade do sistema na detecção de MSSA e MRSA em misturas complexas simulando bacteremia. Os resultados obtidos com o presente projeto poderão pavimentar o caminho para o desenvolvimento de um diagnóstico rápido, sensível e específico, capaz de identificar agentes infecciosos diretamente do sangue de pacientes com sepse em poucos minutos.

Com os avanços no sequenciamento de nova geração, diversas mutações pontuais já foram correlacionadas com um conjunto de síndromes chamadas de encefalopatias epilépticas de início precoce (EIEE). Nessas síndromes, os espasmos epilépticos e as convulsões que ocorrem desde a primeira infância levam ao comprometimento do desenvolvimento neurológico infantil. A variante R87C da proteína CYFIP2 foi recentemente relacionada à EIEE. CYFIP2 é caracterizada como proteína de interação à FMRP, proteína de regulação da tradução celular, e participa do complexo WRC, envolvido na regulação da formação de filamentos de actina. Com sua proteína homóloga, CYFIP1, compartilha 95% de similaridade. CYFIP1 possui estrutura cristalográfica determinada dentro do complexo, enquanto CYFIP2 não possui nenhuma estrutura depositada. Dentro do WRC, o resíduo variante está na interface entre CYFIP2 e WAVE1. Assim, existe a hipótese, corroborada por modelos experimentais, de que a modificação R87C enfraquece essa interação, permitindo a ativação constante do complexo. Realizamos previamente a identificação de ligantes de CYFIP2 R87C e possíveis alvos terapêuticos por análise in silico utilizando o “docking” molecular seguido de simulações de dinâmica molecular. Essa caracterização nos permitiu identificar compostos que potencialmente se ligam de forma seletiva à proteína variante. Por isso, o primeiro objetivo deste trabalho consiste na validação in vitro da interação destes compostos. Realizamos também novas simulações de dinâmica molecular de maneira a investigar os efeitos da variante R87C de CYFIP2 dentro do complexo WRC. Nossas simulações mostraram uma flexibilização do loop entre os resíduos 80-110 devido à perda de contatos internos na variante. Como próximos objetivos pretendemos realizar a caracterização estrutural da proteína e o interatoma diferencial de CYFIP2 e CYFIP2 R87C para compreender os impactos da mutação dentro e fora do complexo WRC. Essas análises podem contribuir para melhor entendimento das funções da proteína dentro e fora do contexto da patologia e possíveis abordagens terapêuticas.

---

**Jhenifer Yonara de Lima**

---

Doutorado

9/1/2021

Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza

L-asparaginases bacterianas: desvendando o mecanismo de ação e imunogenicidade visando o desenvolvimento de biofármacos aprimorados.

---

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é o principal câncer na infância, no qual os linfócitos não se diferenciam e acabam por proliferar-se desenfreadamente. L-asparaginase de *Escherichia coli* (EcA) é a enzima utilizada, desde 1978, no tratamento da LLA para depleção de L-asparagina circulante, impedindo o crescimento de tumores. Seu uso é imprescindível para o sucesso do tratamento, mas causa efeitos colaterais como reações tóxicas, decorrentes de sua inespecificidade pois essa enzima também hidrolisa L-glutamina prejudicando o fígado. Além disso, há o desenvolvimento de mecanismo de resistência que acomete até 75% dos pacientes, através da geração de anticorpos anti-asparaginase. Portanto, o objetivo deste projeto é investigar os mecanismos associados a hidrólise de L-glutamina por EcA, além de identificar sítios de interação da enzima nativa com o antígeno leucocitário humano (HLA). Para isso foram produzidos clones contendo a sequência nativa e outros três carregando mutações em resíduos específicos de EcA. Também a obteve-se um clone para produção de HLA-DRB1\*07:01, associado a uma maior reação imunológica. EcA nativa e mutadas foram produzidas em sistema procarioto e purificadas por cromatografia de afinidade e troca iônica, seguido de liofilização das amostras. Sua atividade foi testada com o reagente de Nessler, sua estabilidade e raio hidrodinâmico (RH) obtidos por NanoDSF e DLS. As diferentes construções de EcA são puras e estáveis, e seu RH corresponde a conformação de tetrâmero. O screening de atividade mostrou a capacidade das diferentes construções de EcA para hidrólise de asparagina e glutamina. Com relação ao HLA-DRB1\*07:01 este é insolúvel quando expresso em sistema procarioto, solubilizado com lisozima e ureia, e purificado por cromatografia de afinidade, mas ainda são necessários mais etapas de purificação, além do refolding, para análise de interação com EcA. Os dados finais desse projeto serão relevantes para construir um novo clone de EcA para o tratamento da LLA.

---

Doutorado

3/1/2019

Stenio Fragoso Perdigão

Monitoramento da taxa de saturação de oxigênio no sangue (SpO<sub>2</sub>) sem contato físico utilizando o método de magnificação de vídeo Euleriana (EVM).

O oxímetro de pulso é um método não invasivo amplamente utilizado para a obtenção da SpO<sub>2</sub> (nível de saturação de oxigênio no sangue). Entretanto, seu uso necessita de contato físico como o paciente monitorado. O uso por tempo prolongado, desse tipo de equipamento, pode ocasionar lesões na pele e desconforto ao indivíduo monitorado. Pacientes que apresentam dermatite de contato, recém-nascidos, idosos, vítimas de queimaduras, por exemplo, o contato com os sensores utilizados nos equipamentos de monitoramentos diminui a qualidade de vida desses pacientes, devido ao desconforto gerado pelo contato físico. Por conta da covid-19 o contato físico deve ser evitado, tanto para proteção dos pacientes quanto dos profissionais de saúde. Alguns indivíduos com covid-19 não apresentavam dificuldade em respirar, mas apresentam a SpO<sub>2</sub> perigosamente baixa. Com base no exposto acima surgiu uma questão de pesquisa: É possível monitorar o nível de saturação de oxigênio no sangue sem contato com o indivíduo? O método de magnificação de vídeo Euleriana (EVM) é uma técnica computacional de processamento de imagem que evidencia mudanças de cor e movimento que são imperceptíveis ao olho humano. Portanto, para responder à questão levantada foi utilizado o método EVM para obter a SpO<sub>2</sub> utilizando imagens de vídeo. Para avaliar a acurácia do aplicativo proposto foram monitorados 52 indivíduos (nas mesmas condições de pressão, temperatura e iluminação) pelo software proposto e por um oxímetro de pulso convencional. Os valores obtidos para a SpO<sub>2</sub> pelos dois métodos serão comparados entre si. Para verificar se a solução proposta é similar ao oxímetro de pulso será analisado se o dispositivo proposto atende aos requisitos mínimos presentes na norma ABNT NBR ISO 80601-2-61:2022 que especifica os critérios para avaliação de oxímetro de pulso.

Desde que foi identificado em Wuhan na China, o vírus SARS-CoV-2 rapidamente atingiu status pandêmico, causando milhões de mortes mundialmente e profundos impactos socioeconômicos. Diante desse panorama, esforços mundiais permitiram a aprovação de vacinas eficazes em tempo recorde. Embora a vacinação tenha nitidamente impactado a transmissão e mortalidade da COVID-19, o surgimento de variantes de SARS-CoV-2 e o acesso desigual dos países à vacinação ainda ameaçam o controle da pandemia. Portanto, o monitoramento contínuo do status imunológico da população é de suma importância para auxiliar as políticas de vacinação e combate à pandemia. Nesse âmbito, os testes de neutralização por redução de placas (PRNT) são frequentemente usados em estudos como indicadores de proteção imunológica, porém são laboriosos, demorados e pouco aplicáveis em larga escala. O presente estudo teve como objetivo produzir anticorpos monoclonais (mAbs) anti-SARS-CoV-2 e aplicá-los na padronização de um teste de neutralização por fluorescência em larga escala e em um ensaio de imunohistoquímica. Até o momento, foram gerados 24 hibridomas produtores de anticorpos contra SARS-CoV-2, dos quais 3 são monoclonais. Os 3 mAbs foram concentrados e caracterizados, sendo os mAbs 1 e 2 do isotipo IgG1 e o mAb 3 IgG2a, todos com cadeia leve kappa. Os mAbs tiveram diferentes padrões de reconhecimento das variantes de SARS-CoV-2 Gamma e Delta e Ômicron por imunofluorescência. Ademais, as análises de Western blot indicaram que o mAb 1 possui especificidade ao nucleocapsídeo viral, enquanto o mAb 2 reconheceu a subunidade 1 da Spike (S1) e o mAb 3 reconheceu o domínio de ligação ao receptor (RBD). O mAb 3 foi aplicado no desenvolvimento e padronização do teste de neutralização por fluorescência, gerando resultados com alta concordância com a técnica padrão-ouro PRNT e representando uma alternativa rápida e confiável para mensurar anticorpos neutralizantes.

Doutorado

9/9/2021

Alessandra Melo de Aguiar

Desenvolvimento e validação interna de ensaio de adipogênese para pesquisa de agentes antiobesidade e disruptores endócrinos

As células-tronco adultas humanas se mostram promissoras como modelos do estudo de doenças e avaliação de novas drogas, uma vez que é possível avaliar seus efeitos não apenas na viabilidade celular mas também no processo de diferenciação celular, ou mesmo em células já diferenciadas. Assim, vêm sendo de grande aplicação como métodos alternativos ao uso de animais em ensaios pré-clínicos e avaliação de toxicidade de diversas substâncias, uma vez que a diferenciação tem se mostrado mais sensível que a viabilidade celular. Este projeto busca desenvolver métodos alternativos ao uso de animais baseado na diferenciação adipogênica de células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo para prospecção de agentes antiobesidade e disruptores endócrinos, contaminantes ambientais que vêm sendo relacionados ao desenvolvimento de obesidade, uma vez que outros desfechos, diretamente associados ao metabolismo de lipídeos até o momento não foram explorados e apresentam grande potencial de aplicação, tanto para a triagem de novos medicamentos quanto para a predição de agentes causadores da obesidade. O modelo utilizado é a adipogênese de células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo e avaliação da interferência de agentes antiobesidade e disruptores endócrinos no processo de diferenciação celular. Este projeto é de grande relevância como método alternativo ao uso de animais, visando à redução do seu uso, e também por utilizar células-tronco de origem humana durante a diferenciação celular em adipócitos na triagem de substâncias que possam interferir especificamente com a adipogênese in vitro, tanto para a triagem de medicamentos antiobesidade quanto para identificação de possíveis disruptores endócrinos.

Doutorado

3/19/2019

Fabiano Borges Figueiredo (orientador) e Luis Gustavo Morello (Coorientador)

SELEÇÃO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE ANTÍGENOS NATIVOS E RECOMBINANTES PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA FASCIULOSE BOVINA

A fasciolose bovina é uma zoonose causada pela *Fasciola hepatica*. Em bovinos, a infecção pela *F. hepatica* é responsável por perdas na produção de carne e leite. O diagnóstico da fasciolose bovina é realizado pela presença do parasita no fígado ou pelo exame coproparasitológico (contagem ovos nas fezes – padrão ouro). Como alternativa mais rápida, métodos imunoenzimáticos são considerados ferramentas importantes na identificação da fasciolose em humanos e animais. O objetivo foi selecionar e validar antígenos nativos e recombinantes para o diagnóstico da fasciolose bovina por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Antígenos nativos (antígeno somático [FhSA] e proteínas do sistema excretório/secretório [FhES]) foram extraídos do parasita coletado diretamente no abatedouro. A catepsina L recombinante (FhrCL-1) foi expressa em levedura e purificada por cromatografia de afinidade. Foram construídos dois painéis sorológicos de bovinos. O primeiro painel (139 amostras), coletado em abatedouro e confirmado pela presença do parasita no fígado bovino, e segundo (500 amostras), coletado de bovinos em propriedades rurais e confirmado pelo coproparasitológico. Realizou-se a otimização e validação de um teste de ELISA utilizando como antígeno o FhSA, o FhES e a FhrCL-1. Quando o FhSA foi o antígeno, os resultados de sensibilidade e especificidade para as amostras do abatedouro foram 70% e 78%, respectivamente, e para as amostras de propriedades, de 63% e 70%. A FhES apresentou os melhores resultados como antígeno para ambas as amostras de abatedouro e propriedades, com sensibilidade de 70% e 79%, e especificidade de 78% e 77%, respectivamente. Quando a FhrCL-1 foi o antígeno, observou-se especificidade alta, de 95% e 96% para abatedouro e propriedade, respectivamente, porém baixa sensibilidade (60% e 42%). Os resultados sugerem a utilização de antígenos nativos e recombinantes como uma ferramenta para auxiliar no diagnóstico sorológico da fasciolose bovina. No entanto, é necessário aprimorar os resultados obtidos e disponibilizar o teste comercialmente.

Em março de 2020 a OMS declarou estado de pandemia para doença do Coronavírus 2019, causada pelo vírus SARS-CoV-2. A realização rápida e em grande escala de testes diagnósticos para a identificação da população infectada é um dos pontos cruciais para o controle de infecção e para o estabelecimento de parâmetros de isolamento e transmissibilidade em um cenário pandêmico. A detecção molecular de SARS-CoV-2 baseia-se em ensaios de RT-qPCR, técnica considerada padrão-ouro para o diagnóstico de infecção por vírus de RNA. Porém, a realização deste ensaio é demorada, requer mão de obra altamente especializada, além de equipamentos caros e sofisticados. A técnica de LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) é simples, rápida e pode vir a ser amplamente utilizada no diagnóstico molecular de várias doenças. No LAMP, o uso da enzima Bst DNA polimerase, que possui atividade de deslocamento de fita, é o diferencial que torna a amplificação isotérmica. Além disso, a detecção da amplificação pode ser analisada pela mudança de coloração da reação, tornando o LAMP um ensaio simples e de baixo custo, que dispensa o uso de equipamentos complexos, instalações e mão de obra especializadas, e tem fácil aplicação em grande escala e em point-of-care. Neste projeto de doutorado foi proposto o desenvolvimento de um teste diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 utilizando a técnica de RT-LAMP, com Bst DNA polimerase produzida localmente. Para alcançar estes objetivos foram realizadas a expressão e a purificação da enzima Bst DNA polimerase, e estão sendo realizadas as padronizações para a validação do teste diagnóstico molecular utilizando esta enzima. Também serão desenvolvidas a formulação e a liofilização dos insumos para o teste de RT-LAMP. O diferencial deste projeto é oferecer uma alternativa para substituir o kit comercial disponível, possibilitando a simplificação e conseqüente descentralização do diagnóstico molecular de COVID-19, destacando que os resultados obtidos possuem enorme potencial de adaptação para outros diagnósticos moleculares baseados em LAMP.

Doutorado

3/1/2021

Letusa Albrecht (Orientadora) e Priscilla Fanini Wowk (Co orientadora).

Avaliação do efeito de vesículas extracelulares de células endoteliais na infecção por *Toxoplasma gondii*

**INTRODUÇÃO:** *Toxoplasma gondii* é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa e é o agente etiológico da toxoplasmose, uma doença que afeta animais de sangue quente, incluindo seres humanos. No contexto infeccioso, vesículas extracelulares (VEs) oriundas de diferentes patógenos ou de células hospedeiras podem ser favoráveis ou não para a contenção da infecção. Diversos estudos estão revelando a importância das VEs em diferentes processos infecciosos. **OBJETIVO:** avaliação do efeito de VEs sobre a infecção por *T. gondii*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foi realizado um comparativo entre refrigeração e congelamento de VEs de HBMEC. As partículas foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), análise de rastreamento de nanopartículas (ARN) e quantificadas pela presença de proteínas. Células de linhagem HBMEC (human brain microvascular endothelial cell) e HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) foram pré-tratadas com VEs oriundas de taquizoítas ou de células infectadas ou não. Após isso, elas foram infectadas com *T. gondii* e a taxa de infecção foi avaliada. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** A concentração e a distribuição de VEs são mantidas após refrigeração, congelamento ou múltiplos congelamentos. Entretanto, não é possível quantificar indiretamente VEs congeladas por meio da presença de proteínas. Avaliação por MET indica a alteração da morfologia de VEs congeladas múltiplas vezes. HBMEC e HUVEC estimuladas com VEs produzidas por HBMEC apresentam uma taxa de infecção por *T. gondii* reduzida. O estímulo com VEs de *T. gondii* aumenta a taxa de infecção em HBMEC, mas não em HUVEC. **CONCLUSÕES PARCIAIS:** As taxas de concentração e distribuição de VEs são mantidas após o congelamento e HBMEC e HUVECs estimuladas com VEs de HBMEC infectada ou não, possuem uma taxa de infecção reduzida.

Entender esses mecanismos e o processo de migração celular e a disseminação viral, auxilia em estratégias de diagnósticos, tratamentos, bem como profilaxia, através de desenvolvimento de vacinas. Deste modo, o foco é investigar a ativação e migração celular, de neutrófilos e células dendríticas em modelo murino após desafio com dengue e Zika vírus. Animais imunocompetentes C57/Bl6, de ambos os sexos, foram inoculados no coxim plantar das patas traseiras com DENV e ZIKV, e analisados em diferentes tempos: 10 min, 1, 3, 6, 24, 48 e 72 horas pós-infecção. Linfonodos (LND – poplíteo, lombar aórtico e ciático), baço, sangue e fígado foram avaliados por ensaio de imunodeteção por foco (FFU), para a migração viral. Para avaliar a migração celular, além dos inóculos com DENV e ZIKV, animais foram inoculados com vírus da febre amarela (YF-17DD), como controle positivo de migração BCG, e controle negativo PBS. Duas horas ou 48h após inóculo viral, os animais foram inoculados no mesmo sítio com CFSE. Após 24h e 72h de infecção as células dos LND poplíteos (LNDp) foram recuperadas e analisadas por citometria de fluxo, com amplo painel de imunofenotipagem. Foi possível detectar DENV nos primeiros tempos de infecção – 10 min, 1, 3 e 6 hpi apenas nos LND drenantes, especialmente no LNDp. Os ensaios com ZIKV ainda estão em andamento. Além disso, 72 hpi observa-se uma linfadenopatia no LNDp, com aumento de diferentes populações celulares, presença de fagócitos como neutrófilos (CD11<sup>high</sup>Ly6G<sup>high</sup>) e monócitos (CD11<sup>high</sup>Ly6G<sup>low</sup>), linfócitos, Células dendríticas e linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. No entanto, ao analisar as células que podem migrar do sítio de infecção para os LNDs apenas células dendríticas (MHC-II<sup>high</sup>CD11c<sup>+/low</sup> e CD11b<sup>high</sup>EPCAM<sup>low</sup>) - CSFE<sup>+</sup> foram encontradas. Os dados obtidos auxiliarão na compreensão da patologia desencadeada por estas viroses e na busca por alvos para novas terapias e vacinas.

Doutorado

4/1/2022

Letusa Albrecht\* e Priscilla Wowk

Avaliação da imunogenicidade de uma vacina experimental multi-estágio no combate à malária vivax

A malária causada pelo Plasmodium vivax ainda é um sério problema de saúde pública no mundo, e no Brasil aproximadamente 150 mil pessoas foram infectadas pelo P. vivax em 2019. A doença causa séria morbidade aos pacientes acometidos pelo parasito, sendo que este muitas vezes adquire resistência aos quimioterápicos utilizados no seu combate. Vacinas são uma das maneiras mais efetivas para a prevenção e eliminação de doenças infecciosas. Até o momento não existe nenhuma vacina no combate à malária vivax e poucas formulações encontram-se em estudo. Uma das maiores dificuldades de uma vacina anti-malárica é a complexidade do parasito. Este apresenta um ciclo de vida bastante complexo, com diferentes estágios evolutivos. Assim, o objetivo deste projeto é avaliar a imunogenicidade de uma vacina experimental multi-estágio no combate ao Plasmodium vivax. Para isso, foram selecionados um antígeno parasitário hepático (L1), um de fase eritrocítica (E1) e um de estágio sexual (S1), além de um antígeno quimérico (Q) contendo epítomos imunodominantes de cada um destes antígenos. Esses antígenos serão expressos e utilizados em imunizações de camundongos em sistema prime-boost heterólogo (DNA-proteína). Após as imunizações, será avaliada a resposta humoral e celular gerada nesses animais. Por fim, os anticorpos produzidos serão avaliados em experimentos de bloqueio de invasão e transmissão de P. vivax. Espera-se que ao final deste projeto tenha-se obtido uma formulação vacinal promissora.

Doutorado

3/1/2019

Orientador: Bruno Dallagiovanna ; Coorientadora: Isabela Tiemy Pereira

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE CSDC2 DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CARDÍACA DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte global. O transplante de órgãos continua sendo o tratamento mais eficaz para problemas cardíacos, entretanto esta abordagem é limitada pela escassez de doadores. Nesse contexto, o potencial uso clínico de células-tronco pluripotentes (CTP) como terapia alternativa tem estimulado o desenvolvimento de métodos que promovam a diferenciação das CTP em cardiomiócitos. Assim, entender o mecanismo regulador desse processo é essencial para otimizar protocolos de diferenciação cardíaca. Dados preliminares mostraram aumento da expressão do gene Cold Shock Domain Containing 2 (CSDC2) durante a diferenciação cardíaca de CTP, levantando a hipótese de que CSDC2 poderia ter um papel fundamental regulando esse processo. Portanto, esse estudo tem como objetivo investigar o papel do CSDC2 durante a diferenciação cardiomiogênica humana. Para confirmar nossa hipótese, analisamos a expressão de CSDC2 por qPCR em duas linhagens de CTP (H1 e PLZ) durante a diferenciação cardíaca. Em ambas as células, houve aumento da expressão de CSDC2 no estágio final da diferenciação cardíaca. Usando a tecnologia CRISPR/cas9n, derivamos a linhagem PLZ KO CSDC2, por sequenciamento de Sanger identificamos uma deleção de oito nucleotídeos no genoma que causa um frameshift na ORF do gene. A PLZ KO CSDC2 foi caracterizada e exibiu cariótipo, marcadores de pluripotência (OCT4, SSEA4, TRA1-60) e morfologia regulares, confirmando seu estado de pluripotência. Em seguida, a PLZ WT e PLZ KO CSDC2 foram submetidas ao protocolo de diferenciação cardíaca, cuja eficiência foi medida pela expressão do marcador de cardiomiócito (TNNT2) por citometria de fluxo e taxa de batimentos. O nocaute de CSDC2 em PLZ diminuiu o número de cardiomiócitos e áreas de batimento em cultura após a diferenciação quando comparado a células do tipo selvagem, este fenótipo indica que CSDC2 tem um papel importante na diferenciação cardíaca sendo um gene promissor para estudar seu mecanismo de regulação.

Doutorado

3/1/2020

Principal: Lysangela Ronalte Alves Co-orientador: Samuel Goldemberg

Caracterização das proteínas de ligação ao RNA presentes nas vesículas extracelulares de *Cryptococcus neoformans*

Vesículas extracelulares (VEs) são estruturas lipídicas compostas por duas camadas, liberadas por células de várias espécies para o espaço extracelular. Dentre muitas de suas funções está a comunicação entre células, sendo um mecanismo amplamente utilizado para a transferência de proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e outras moléculas biologicamente ativas. O conteúdo das VEs inclui: proteínas de membrana, proteínas de sinalização, do citoesqueleto, proteínas específicas do tipo da célula produtora e RNAs. As moléculas de RNA presentes nas VEs podem ser mRNAs, microRNAs (miRNA) ou espécies de pequenos RNAs não codificantes, os quais possuem o potencial de regulação de expressão genica nas células alvo. O processo de transcrição do RNA é seguido pela associação de proteínas de ligação ao RNA (RNA-binding proteins - RBPs) recém transcrito. A associação das RBPs com RNA ocorre através dos domínios de ligação ao RNA presentes nas RBPs, que podem ser singulares ou múltiplos. As RBPs auxiliam em todas as etapas do ciclo do RNA, podendo inclusive atuar na seleção das moléculas de RNA que são direcionadas às VEs. Vários patógenos podem produzir e transferir VEs, fornecendo um meio de comunicação fúngica com hospedeiros e entre células fúngicas. A produção de VEs em várias espécies fúngicas tem sido caracterizada nos últimos anos e estudos recentes identificaram moléculas de RNA nas EVs em *Cryptococcus neoformans*, e outras espécies de fungos. O mecanismo que seleciona as moléculas de RNA para as VEs ainda segue desconhecido, portanto, o objetivo desse trabalho é determinar as vias que direcionam certos RNAs para as VEs através de estudos das RBPs presente nas vesículas.

Doutorado

3/11/2020

Marco Stimamiglio

Recriação do nicho hematopoiético em arcabouços 3D multifuncionalizados para expansão de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas

A recriação da fisiologia hematopoiética in vitro mediante plataformas que recapitem as relações funcionais que ocorrem nos microecossistemas onde as células troncos/progenitoras hematopoiéticas (CT/PHs) residem e se multiplicam in vivo, possibilita o estudo controlado da hematopoiese como processo. Por outro lado, tendo em vista a problemática decorrente da baixa quantidade de células que se obtém do sangue de cordão umbilical e placentário, diversas estratégias tem sido utilizadas na tentativa de viabilizar a aplicação desta fonte de células para transplantes. Dentre as estratégias que visam o aumento da dose celular, as propostas baseadas em sistemas de co-cultivo de CT/PHs com células estromais mesenquimais (CE/Ms) da medula óssea sob arcabouços tridimensionais (3D) porosos, vem sendo amplamente exploradas. A placenta humana, a qual é um órgão com grande capacidade de expansão de CT/PHs durante todo o desenvolvimento embrionário, apresenta populações de células-tronco especialmente atrativas com características típicas de CE/Ms. Assim, a construção e otimização de um sistema de co-cultivo de CT/PHs com CEM da placenta humana sobre arcabouços porosos 3D multifuncionalizados representa uma estratégia atrativa como plataforma-modelo de nicho hematopoiético. Todavia, esta construção bioartificial representará uma opção de estudo do comportamento das CT/PHs na busca pelas condições ideais de expansão.

A COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, exibe desfechos graves em indivíduos com hipertensão e diabetes, doenças que acometem o endotélio; e a formação de trombose é associada a disfunção endotelial. Células endoteliais (CEs) não parecem ser o principal alvo do vírus, mas não está claro se a disfunção endotelial é causada por infecção direta ou devido à inflamação secundária. Nosso objetivo é avaliar a resposta de CEs ao estímulo do SARS-CoV-2 e o efeito da hiperglicemia. Para isso, células HBMEC foram cultivadas em RPMI + glucose 5,5 mM (hipoglicemia) ou 33,0 mM (hiperglicemia) e o proteoma de cada condição analisado por LC-MS/MS. A proteína do nucleocapsídeo, Spike e domínio RBD de SARS-COV-2 foram expressos em sistema eucariótico (HEK293) e purificados em colunas de níquel. As proteínas foram dosadas e submetidas à SDS-PAGE. O endotélio foi estimulado com 10 µg/ml de cada proteína viral e 0,1 MOI de vírus inativado (VI), assim como os controles (PBS e TNFα). Após 16-18 horas, a ativação de marcadores endoteliais foi analisada por citometria de fluxo (FACSCanto II) e qPCR (QuantStudio 5), com β-actina como gene endógeno. O proteoma das HBMEC mostrou 11% de proteínas diferencialmente expressas entre as condições normo e hiperglicêmicas. Em 33 mM glucose, a via metabólica do piruvato estava enriquecida. HBMECs expostas ao VI ou às proteínas virais mostraram alterações à níveis transcricionais e de expressão proteica. O aumento da expressão relativa (mRNA) de genes pró-inflamatórios ocorreu especialmente frente aos estímulos virais em hiperglicemia. Enquanto genes de supressão e angiogênese apareceram aumentados na normoglicemia. Similarmente, a expressão da proteína ICAM-1 foi ligeiramente aumentada nos estímulos em 33 mM, comparado à 5,5 mM glucose. Até o momento, nossos dados indicam que o endotélio cerebral mantido sob hiperglicemia in vitro apresenta um perfil inflamatório que é exacerbado em contato com os antígenos de SARS-CoV-2.

Doutorado

3/1/2021

Lucas Blanes

Novas abordagens para tratamento e diagnóstico de doenças transmissíveis e não transmissíveis em ambientes hospitalares.

A presente tese vem sendo organizada no formato de capítulos, sendo o primeiro e o segundo relacionados ao tratamento de doenças transmissíveis, e o terceiro referente a novas tecnologias para diagnósticos de doenças não transmissíveis. Importante salientar que toda a pesquisa está sendo executada em ambiente hospitalar.

Capítulo I: Neste capítulo descreveremos todo processo de criação de ensaio clínico randomizado aberto, com pacientes COVID-19 internados em 2022 no Hospital do Rocio – Campo Largo-PR, para compreender o efeito da utilização de plasma convalescente no tratamento clínico. O recrutamento de pacientes já foi finalizado e os resultados primários já estão concluídos. Este capítulo fará parte da apresentação deste primeiro relatório.

Capítulo II: Estudo de Coorte retrospectiva de pacientes não imunizados internados por COVID-19 que realizaram tratamento com plasma convalescente nos anos de 2020 e 2021.

Capítulo III: Estudo de Coorte prospectiva do Perfil Clínico – Epidemiológico de pacientes internados por Infarto Agudo do Miocárdio e do uso de testes rápidos imunocromatográfico em ambientes hospitalares.

Os capítulos I e II estão relacionados à temática Covid-19, contudo com o processo de vacinação e consequente redução da pandemia, o uso de plasma convalescente como tratamento não foi mais utilizado, alterando a necessidade de manter a pesquisa ativa. Por esse motivo, o redirecionamento da pesquisa em doenças cardiovasculares (capítulo III) passou a ser o centro de atenção, sendo um agravo com letalidade alta no estado, com impacto importante para a saúde, e pelo fato da doutoranda estar desenvolvendo atividades com pesquisa na área de uso de testes rápidos para diagnóstico de Infarto do miocárdio em ambiente hospitalar.

Doutorado

3/1/2021

Fabiano Borges Figueiredo (orientador); Patrícia Shigunov (coorientadora).

PERFIL POLIMÓRFICO DE GENES E PROTEÍNAS DO SISTEMA COMPLEMENTO EM INDIVÍDUOS PROVENIENTES DE ÁREAS ENDÊMICAS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E SUA IMPORTÂNCIA NO PROCESSO DE INFECÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa causada principalmente por parasitos do gênero *Leishmania*, caracterizada pela formação de lesões arredondadas com borda elevada, granulações e secreções, que afeta principalmente países subdesenvolvidos e parcelas menos favorecidas da população. A doença é transmitida através do repasto sanguíneo da fêmea do flebotômio infectada com os parasitos. A resposta do sistema imunológico frente a doença pode variar de acordo com o paciente e é determinante para a manifestação da doença. As proteínas do sistema complemento atuam na opsonização do parasito, o qual é encaminhado para a fagocitose mediada por receptores, crucial para a sobrevivência do patógeno no hospedeiro. Já foi evidenciado que polimorfismos envolvendo receptores de células da imunidade inata e adaptativa, bem como proteínas da via das lectinas do complemento atuam diretamente na resistência do parasito contra as defesas do seu hospedeiro, tanto para a forma tegumentar quanto para a manifestação visceral da doença. Serão avaliadas novas formas de polimorfismos em genes essenciais para a ativação da cascata do complemento em 45 pacientes com suspeita de LTA provenientes de áreas endêmicas para a doença. Após o diagnóstico por PCR, será avaliada a capacidade leishmanicida desencadeada pelo soro desses pacientes por citometria de fluxo e será feita uma triagem de grupos que apresentam tanto mais lise quanto menos lise. Esses grupos serão encaminhados para sequenciamento a fim de investigar polimorfismos envolvidos no fenótipo observado. Os soros serão também submetidos a uma análise de nível de expressão das proteínas do complemento por espectrometria de massas.

Doutorado

3/18/2020

Fabio Passeti (principal), Marcio Rodrigues (coorientador)

Análise comparativa de proteômica shotgun em cérebros de humano, rato e camundongo com fenótipo de neuropatologia

O cérebro dos vertebrados é um órgão complexo cujo funcionamento ainda não é entendido completamente. Compreender os mecanismos moleculares associados ao cérebro é um dos fatores que pode contribuir para caracterizar risco ao desenvolvimento de diversas neuropatologias, inclusive quando associadas à infecção de um algum microorganismo. A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que acomete o cérebro do ser humano, sendo associada a polimorfismos genéticos herdados. Atualmente, há diversos trabalhos que avaliam as proteínas expressas em regiões cerebrais do ser humano com DA ou em modelos experimentais de rato e camundongo. Já foi observado que a injeção de vesículas extracelulares (VEs) oriundas de pacientes com doenças neurodegenerativas em modelos murinos resulta no desenvolvimento do mesmo fenótipo observados nos pacientes. Além de células humanas, microrganismos também são capazes de produzir VEs. Raros são os patógenos capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) e causar uma infecção no Sistema Nervoso Central (SNC). O reconhecimento dos antígenos desses patógenos gera um processo inflamatório no SNC que pode ativar vias neurotóxicas e neurodegenerativas. Ainda que o SNC não seja o sítio inicial de infecção, mediadores inflamatórios, assim como diversos antígenos, podem ser carregados por VEs até o cérebro e atravessar a BHE. O nosso grupo desenvolveu e publicou um banco de dados online denominado ExVe (<http://exve.icc.fiocruz.br/>) que reúne informações sobre proteínas encontradas em VEs de nove fungos patogênicos e um não patogênico. A hipótese deste projeto é que existe semelhança na composição de proteínas, principalmente associadas a vias neuroinflamatórias, identificadas nas regiões do cérebro do ser humano, rato e camundongo. Neste contexto, buscamos avaliar as proteínas identificadas em experimentos de proteômica shotgun de diferentes regiões do cérebro do ser humano, rato e camundongo em condições de DA, indivíduos saudáveis e camundongos submetidos a injeção com VEs de patógenos.

Doutorado

3/1/2022

Leonardo Foti

Desenvolvimento de modelos de peles de dermatite atópica in vitro, com a utilização de células primárias humanas

A pele é o maior órgão humano, que reveste a superfície do corpo protegendo-o como uma barreira física contra agentes externos e dessecação. Ela é dividida em duas camadas que se sobrepõem (i.e. epiderme e derme), e contêm tipos celulares e funções diferentes. Por ser um órgão que está exposto ao ambiente, é suscetível a constante exposição de agentes externos, que podem danificá-lo. Além disso, a pele de algumas pessoas pode ser mais sensível a essas exposições, por apresentar doenças como a dermatite atópica (DA). O desenvolvimento de novos medicamentos e cosméticos requer do setor industrial a avaliação de riscos à saúde humana decorrentes do uso destes produtos/compostos, não só em pele normal, mas também em pele com doenças como DA. Diferentes animais vêm sendo utilizados há anos em pesquisas de desenvolvimento de medicamentos, produtos cosméticos e vacinas, sendo assim, úteis para a compreensão de efeitos causados pelo uso/exposição destes produtos. Porém, esses modelos são cada vez mais criticados quanto ao seu uso em pesquisas científicas devido à dificuldade de extrapolação de dados para outros organismos, como a condições de doença no humano. De maneira a sanar esses desafios, o objetivo deste trabalho é desenvolver modelos de peles de dermatite atópica in vitro, com a utilização de queratinócitos primários humanos modificadas por edição gênica (CRISPR-Cas9), a fim de avaliar a potencial utilização destes modelos em estudos de novas terapias.