

Mestrado

2/1/2022

Alejandro Correa (Orientador) e Bruna Marcon (Coorientadora)

Avaliação in vitro do potencial uso de arcabouços 3D de alumina funcionalizados com vesículas extracelulares para a regeneração óssea.

A medicina regenerativa visa, entre outras coisas, novas abordagens para o reestabelecimento da função do tecido ósseo lesionado. Para tanto, o uso de arcabouços 3D combinado com células-tronco ou seus subprodutos vem se desenvolvendo rapidamente. Um biomaterial promissor é a alumina, um composto cerâmico já estudado em tratamentos odontológicos. As células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam atividade parácrina liberando vários fatores solúveis e vesículas extracelulares (VEs), sinalizadores biológicos com potencial regenerativo. O objetivo desse trabalho é avaliar in vitro o uso dos arcabouços de alumina funcionalizados com as VEs de CTM como uma proposta de tratamento para as lesões ósseas. Para isso, os arcabouços foram produzidos através da técnica de espumação direta, com sua ultraestrutura caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), visualizando a superfície porosa e granulosa do arcabouço. Realizou-se a padronização da esterilização do arcabouço em estufa à 160°C por 2 horas, comprovada pela ausência de micoplasma por RT-qPCR. Em seguida, sua citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de captação de vermelho neutro, não apresentando toxicidade para os dois tipos celulares testados, CTM humanas e fibroblastos de camundongos (3T3). Depois, foi avaliada a capacidade de adesão das CTM ao arcabouço, iniciando com 73% e aumentando 3x a quantidade de células ao final de 7 dias. Os arcabouços foram visualizados por MEV e microscopia de fluorescência pela marcação com DAPI e Beta-Tubulina, observando o aumento do número de núcleos e a morfologia fibroblastoide em 3 e 7 dias. Em seguida, serão isoladas as VEs das células-tronco e osteoblastos para a funcionalização dos arcabouços, a fim de avaliar o efeito das VEs na diferenciação osteogênica. Os resultados obtidos sugerem a segurança do uso dos arcabouços de alumina para o cultivo e garantem a interação das células com a superfície do arcabouço.

Mestrado

2/22/2022

Orientador: Mateus Nóbrega Aoki e Co-orientadora: Anelis Maria Marin

Detecção e quantificação de biomarcadores plasmáticos do tipo microRNAs para diagnóstico e prognóstico em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica

Introdução: Leucemias são um tipo de câncer causado pela desorientação dos glóbulos brancos, e seus principais tipos são a LMC, LMA, LLA e LLC. A expressão de alguns genes pode ter interferências na progressão e desenvolvimento de leucemias. MicroRNAs são pequenos RNAs não codificantes que tem potencial para alterar a expressão de alguns genes podendo ser correlacionados com alguns tipos de leucemia e ser utilizados como biomarcadores no diagnóstico e prognóstico de pacientes. A busca por biomarcadores plasmáticos tipo microRNA em pacientes com leucemias pode elucidar moléculas que podem estar alteradas e moduladas em diversas fases da doença, as quais podem ser relevantes variáveis de utilidade clínica. Portanto, esse projeto visa realizar a análise qualitativa e quantitativa de biomarcadores plasmáticos tipo microRNAs em pacientes com leucemia provenientes do Hospital Erasto Gaertner, em recortes de coortes distintas, incluindo pacientes ao diagnóstico, em fases diferentes da doença e seguimento temporal para acompanhamento de evolução.

Objetivo: Detecção e quantificação de biomarcadores plasmáticos tipo microRNAs em pacientes com leucemia mielóide crônica.

Abordagem experimental: Serão coletadas amostras de sangue de pacientes em diferentes pontos da leucemia, dividindo-os em 3 grupos, sendo: pacientes em ponto único com presença de células leucêmicas, pacientes com coletas em pontos seguidos da doença e pacientes em tratamento, mas sem expressão de BCR-ABL e também de doadores saudáveis do banco de sangue que serão o grupo controle. Será extraído RNA do plasma com kit comercial e adição de template de RNA sintético que será utilizado como normalizador. Este RNA será utilizado para a síntese de cDNA dos microRNAs utilizando um kit para síntese universal de microRNAs. Após, a detecção e quantificação vai ser realizada utilizando ensaios Taqman específicos para cada microRNA em equipamentos de PCR em tempo real e os resultados serão analisados estatisticamente e correlacionados com dados clínicos dos pacientes.

Mestrado

3/1/2022

Letusa Albrecht (principal) e Priscilla Wowk

Caracterização da resposta vacinal de um novo candidato no combate à malária vivax

A malária é um dos mais sérios problemas de saúde pública em todo o mundo, sendo responsável por grandes impactos sociais e econômicos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, só em 2020 foram registrados 627 mil óbitos. No Brasil, cerca de 90% dos casos são provocados pelo *Plasmodium vivax*, apesar de apresentar baixa virulência, é o parasito com maior distribuição geográfica e é responsável por grande morbidade nas populações que residem em áreas endêmicas. No entanto, durante décadas, foi negligenciado, refletindo na imensa lacuna do conhecimento a respeito de sua biologia e no desenvolvimento de vacinas. A obtenção de uma vacina segura e eficaz contra o parasito é uma das principais estratégias para seu controle e eliminação, dado a sua capacidade de resistência aos antimaláricos. Contudo, a identificação de novos candidatos vacinais tem sido uma tarefa árdua. Além do baixo investimento em pesquisa, o parasito apresenta um ciclo de vida complexo, que limita a possibilidade de cultivo *in vitro*, e é altamente polimórfico, facilitando a evasão do sistema imune. Dessa forma, novos estudos são fundamentais para identificar candidatos capazes de interromper o desenvolvimento do parasito. Dessa forma, o objetivo desse projeto é avaliar a resposta imunológica contra um novo candidato vacinal no combate à malária vivax. O antígeno aqui selecionado, denominado de PVX01X, foi identificado através de análises *in silico* e foi predito imunogênico e antigênico. A resposta contra este antígeno será comparada com a resposta anti-PvAMA-1, um candidato vacinal amplamente estudado no combate à malária vivax. Esses antígenos serão expressos em sistema eucarioto e, posteriormente, serão utilizados em diferentes esquemas de imunização em modelo murino para avaliação da resposta humoral e celular. Espera-se que a resposta contra o PVX01X seja superior a resposta anti-AMA1 e que esse possa vir a ser um candidato vacinal promissor no combate à malária vivax.

Mestrado

3/4/2022

Helisson Faoro

Prospecção genômica e análise filogenética de enzimas beta-lactamases em bactérias do grupo ESKAPEE

Um dos grandes desafios de saúde pública na atualidade é a resistência aos antimicrobianos. Dentro deste contexto, o grupo ESKAPEE tem grande relevância, pois, é composto pelos principais organismos causadores de infecções nosocomiais: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp. e *Escherichia coli*. Devido a sua resistência à beta-lactâmicos de amplo espectro, com exceção de *E. faecium*, todas bactérias desse grupo são categorizadas como prioridade crítica ou alta quanto à necessidade de desenvolvimento de novos antibióticos. Os beta-lactâmicos são uma classe de antimicrobianos amplamente utilizada na clínica a décadas, entretanto, muitos organismos já apresentam altas taxas de resistência a esses fármacos, em grande parte, devido a produção das enzimas beta-lactamases, que são capazes de hidrolisar a molécula do antibiótico. Esse projeto tem por objetivo avaliar a distribuição das enzimas beta-lactamases nos organismos ESKAPEE. Para isso, será empregada uma abordagem in silico que visa prospectar homólogos de beta-lactamases em genomas com dados fenotípicos de resistência à beta-lactâmicos. A partir desta pesquisa, baseada em perfil HMM, será feita a inferência filogenética do conjunto de dados e a análise do agrupamento das enzimas em relação a variantes conhecidas. Essa abordagem visa adquirir uma visão ampla da dinâmica evolutiva e epidemiológica das quatro classes de beta-lactamases (A, B, C e D), além de contribuir para alocar funcionalmente proteínas anotadas anteriormente como hipotéticas e até identificar novas variantes em potencial.

Mestrado

3/14/2022

Letusa Albretch (orientação principal) e Andréa Rodrigues Ávila

Avaliação do papel de antígenos VIR preditos adesivos na malária vivax.

A malária é a principal parasitose humana e atingiu 229 milhões de pessoas em 2019. A doença é transmitida através da picada do mosquito anofelino infectado com parasitos do gênero *Plasmodium* spp. e chega a matar mais de 400 mil pessoas anualmente. No Brasil, a grande maioria dos casos maláricos ocorre pela infecção por *Plasmodium vivax*. As infecções pelo parasito têm impacto significativo nas populações atingidas, à medida que o curso da infecção é prolongado e o desenvolvimento de imunidade adquirida em área endêmica leva vários anos. Com o aumento do número de casos graves de malária vivax, uma preocupação crescente com métodos alternativos de controle vem surgindo. Fenômenos adesivos, como a adesão ao endotélio e a eritrócitos saudáveis, formando rosetas, são associados a patogênese e a gravidade na malária falciparum. Enquanto os ligantes e receptores envolvidos nestes fenótipos são conhecidos na malária falciparum, pouco se sabe a respeito na malária vivax. Sabe-se que o *P. vivax* adere ao receptor glicoforina C presente no eritrócito, no entanto, o ligante parasitário nesta interação ainda é desconhecido. Existem evidências de que esta interação seria mediada por proteínas VIR, proteínas polimórficas codificadas pela família multigênica dos genes *vir*. Assim, pretende-se avaliar o papel de antígenos VIR nos fenótipos adesivos do *P. vivax*. Para tanto, duas proteínas VIR, preditas adesivas, serão expressas em sistema de expressão heterólogo (procarioto e eucarioto) e avaliadas quanto a sua capacidade de adesão e ativação ao endotélio, bem como a adesão destes à hemácias saudáveis. Ainda, anticorpos anti-VIR, produzidos a partir de camundongos imunizados, serão analisados quanto a capacidade de inibição na adesão das proteínas recombinantes a diferentes endotélios e a hemácias. O entendimento da patogênese do parasito poderá auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de controle deste, como, por exemplo, o descobrimento de novos candidatos vacinais e terapêuticos.

Mestrado

2/1/2022

Dr^a. Lysangela Ronalte Alves

O papel do ácido taurocólico na biologia de *Candida auris* e na interação com as células hospedeiras

Candida auris é um fungo emergente, descrito pela primeira vez em 2009, que causa uma infecção sistêmica e resistente a tratamentos antifúngicos convencionais. A infecção por *C. auris* é nosocomial, ou seja, característica de ambientes hospitalares, e atinge, principalmente, pessoas com sistema imune debilitado ou que estão hospitalizadas. Diante deste cenário, alertas de saúde ao redor do mundo tem focado esforços para compreender os mecanismos de infecção e tratamento terapêutico eficiente para combater este fungo. *C. auris* foi descrita pela primeira vez no Brasil em 2020, em um paciente internado em uma unidade de terapia intensiva em um hospital do estado da Bahia. Esse fato reforça ainda mais a importância de compreendermos esse patógeno e estudos envolvendo a biologia básica dele pode elucidar mecanismo de virulência e resistência a antifúngicos. Esse projeto tem como objetivo realizar uma caracterização molecular de cepas de *C. auris* quando cultivadas na presença de ácido taurocólico, um composto identificado em vesículas exportadas quando tratadas com caspofungina. Dessa forma, esperamos agregar mais conhecimento e auxiliar no entendimento da biologia de *C. auris*.

Mestrado

4/7/2022

Priscilla Fanini Wowk (principal) ; Letusa Albrecht

Avaliação da modulação de células humanas a vacinas de DNA contra malária vivax in vitro.

A malária é um dos maiores problemas de saúde pública mundial. *Plasmodium vivax* é a espécie prevalente no Brasil, com aproximadamente 170 mil pessoas infectadas em 2018. Embora as infecções causadas por *P. vivax* raramente sejam letais, o impacto sobre a produtividade das populações locais é alto. Os indivíduos acometidos por múltiplas infecções acabam adquirindo resistência aos quimioterápicos utilizados no seu combate. O desenvolvimento de métodos alternativos, principalmente focados no combate à malária vivax, vem sendo pouco explorado. Nesse contexto, nosso grupo está desenvolvendo diferentes formulações baseadas em vacinas de DNA com alvo em moléculas multiestágio, em decorrência do complexo ciclo evolutivo do parasita. O foco deste projeto é avaliar a resposta imune in vitro, de células humanas estimuladas com as diferentes construções vacinais. Células dendríticas e macrófagos (células apresentadoras de antígeno profissionais), derivadas de monócitos humanos serão estimuladas com vacinas de DNA (plasmídeos+gene alvo) para um antígeno parasitário hepático (L1), um de fase eritrocítica (E1) e um de estágio sexual (S1), além de uma construção com o gene PvAMA1, como controle de vacinas já em teste. Será avaliada a captura das construções vacinais em solução, assim como a transcrição (RNA mensageiro) e expressão das proteínas por western blot. A modulação de moléculas de ativação e secreção de mediadores inflamatórios por estas células apresentadoras de antígenos será avaliada por citometria de fluxo. Além disso, em ensaios com células mononucleares de sangue periférico (PBMC), utilizando-se a marcação de células com CFSE, corante fluorescente, avaliaremos a proliferação de células T *P. vivax* antígeno específicas, comparando amostras de indivíduos saudáveis e de pacientes com malária. Estes ensaios com células humanas in vitro, evidenciarão o potencial dessas preparações em futuros ensaios clínicos.

Mestrado

3/23/2022

Lysangela R. Alves

Análise transcritômica comparativa de espécies de Candida e associação a resistência a antifúngicos

Candida auris é um fungo emergente conhecido por sua resistência aos antifúngicos mais utilizados, e é o primeiro fungo a ser considerado uma ameaça a saúde pública global, segundo o CDC. C. auris causa uma infecção oportunista resistente a tratamentos antifúngicos convencionais e atinge, principalmente, pessoas imunossuprimidas. Além de ter um tratamento medicamentoso ineficiente, a infecção por C. auris é agressiva, podendo causar a morte do paciente em até 60% dos pacientes. Diante deste cenário, estudos são necessários para compreender os mecanismos de infecção e tratamento terapêutico eficiente para combater este fungo. Estudos de perfil de expressão global de genes em diferentes estágios de infecção por C. auris podem indicar mecanismos utilizados pelo patógeno que podem ser alvo terapêuticos eficientes contra a evolução da infecção. Até o momento, há pouca informação acerca dos genes diferencialmente expressos quando este fungo é tratado com o antifúngicos. Desta forma, tais informações podem ajudar a elucidar os mecanismos de resistência e sobrevivência desse fungo em ambientes hospitalares. O presente projeto tem como objetivo realizar análises de transcritômica comparativa de dados de RNA-seq de diversas espécies de Candida em condições normais e na presença de antifúngicos, buscando identificar transcritos diferencialmente expressos, que podem estar relacionados aos mecanismos ainda não entendidos de resistência em Candida auris. Dessa forma poderemos gerar mais informações sobre a biologia desse patógeno emergente.

Mestrado

3/23/2022

Fabiano Figueiredo Borges (principal) Sheila Nardelli

Caracterização funcional da proteína de superfície TgSRS12B de *Toxoplasma gondii* e seu potencial diagnóstico.

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose, estimada em afetar 1/4 da população mundial. Trata-se de uma doença negligenciada sem cura efetiva. É extremamente severa em pacientes cujo sistema imunológico encontra-se comprometido, como no caso de transplantados, ou infectados com o vírus HIV ou ainda quando adquirida durante a gravidez. Além disso, quando comparado a outras partes do mundo, o Brasil e outros países da América do Sul mostram sintomas mais severos quando comparado a pacientes do Hemisfério Norte. Sendo assim, estudos direcionados a elucidar os aspectos biológicos das cepas circulantes na região certamente poderiam propiciar uma busca por tratamentos e profilaxia direcionados e mais eficientes ao contexto brasileiro. Em estudos prévios do grupo, foi possível identificar proteínas de superfície (SAGs) mais abundantes em isolados brasileiros, em especial a proteína TgSRS12B, majoritariamente, ou exclusivamente presente nos isolados brasileiros (por espectrometria de massas). As SAGs são conhecidas por participar dos primeiros estágios da invasão da célula hospedeira, mais precisamente durante a adesão. Com isso, nos propomos aqui a caracterizar a proteína SRS12B utilizando ferramentas de genética reversa (nockout e superexpressão) bem estabelecidas em *Toxoplasma* e analisar mutantes frente a processos essenciais à sobrevivência do parasita, como capacidade de invasão, replicação e diferenciação espontânea para bradizoítas in vitro. Adicionalmente, a proteína recombinante será obtida e testada quanto a sua imunogenicidade utilizando soros de pacientes, utilizando como controle a proteína SAG1, bastante utilizada na literatura com o intuito de aprimorar testes diagnósticos, atualmente feito principalmente pela detecção de IgG e IgM por sorologia. O estudo de proteínas específicas ou mais expressas em isolados brasileiros poderá auxiliar tanto na compreensão dos nossos isolados, quanto ainda como ainda explicar a maior severidade dos sintomas da toxoplasmose no Brasil ou ainda indicar potenciais alvos para o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes contra essa doença, para a qual ainda não existe cura.

Mestrado

3/23/2022

Fabiano Borges Figueiredo (Principal) e Sheila Nardelli

Caracterização funcional da proteína de superfície TgSRS12B de Toxoplasma Gondii e seu potencial diagnóstico.

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose, estimada em afetar ¼ da população mundial. Trata-se de uma doença negligenciada sem cura efetiva. É extremamente severa em pacientes cujo sistema imunológico encontra-se comprometido, como no caso de transplantados, ou infectados com o vírus HIV ou ainda quando adquirida durante a gravidez. Além disso, quando comparado a outras partes do mundo, o Brasil e outros países da América do Sul mostram sintomas mais severos quando comparado a pacientes do Hemisfério Norte. Sendo assim, estudos direcionados a elucidar os aspectos biológicos das cepas circulantes na região certamente poderiam propiciar uma busca por tratamentos e profilaxia direcionados e mais eficientes ao contexto brasileiro. Em estudos prévios do grupo, foi possível identificar proteínas de superfície (SAGs) mais abundantes em isolados brasileiros, em especial a proteína TgSRS12B, majoritariamente, ou exclusivamente presente nos isolados brasileiros (por espectrometria de massas). As SAGs são conhecidas por participar dos primeiros estágios da invasão da célula hospedeira, mais precisamente durante a adesão. Com isso, nos propomos aqui a caracterizar a proteína SRS12B utilizando ferramentas de genética reversa (nockout e superexpressão) bem estabelecidas em Toxoplasma e analisar mutantes frente a processos essenciais à sobrevivência do parasita, como capacidade de invasão, replicação e diferenciação espontânea para bradizoítas in vitro. Adicionalmente, a proteína recombinante será obtida e testada quanto a sua imunogenicidade utilizando soros de pacientes, utilizando como controle a proteína SAG1, bastante utilizada na literatura com o intuito de aprimorar testes diagnósticos, atualmente feito principalmente pela detecção de IgG e IgM por sorologia. O estudo de proteínas específicas ou mais expressas em isolados brasileiros poderá auxiliar tanto na compreensão dos nossos isolados, quanto ainda como ainda explicar a maior severidade dos sintomas da toxoplasmose no Brasil ou ainda indicar potenciais alvos para o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes contra essa doença, para a qual ainda não existe cura.

Mestrado

4/4/2022

Orientação principal: Dra. Alessandra Melo de Aguiar; Orientação secundária: Dra. Anny Robert.

Prospecção De Aplicação Biomédica E Avaliação De Toxicidade De Nanopartículas De Bismuto (BiNPs): Potencial Em Regeneração Óssea

As nanopartículas (NPs) são materiais com pelo menos 1 dimensão abaixo de 100 nm, apresentam grande superfície de contato e por isso são estudadas para o tratamento de doenças na busca mais efetiva de medicamentos. As NPs podem ser geradas por diferentes métodos que impactam não apenas pelas suas propriedades físico-químicas, como seus efeitos biológicos. As nanopartículas de bismuto (BiNPs) de síntese química demonstram estimular a regeneração óssea e possuir atividade antitumoral e antimicrobiana. Previamente, nosso grupo caracterizou BiNPs de síntese física, avaliando sua citotoxicidade em linhagem de fibroblasto murino e células-tronco mesenquimais (CTMs) humanas, demonstrando que em concentrações não tóxicas reduzem a diferenciação adipogênica, indicando assim um efeito específico. Portanto, este trabalho tem como objetivo caracterizar e avaliar o efeito de BiNPs de síntese física na diferenciação osteogênica. Além disso, considerando o potencial de aplicação, também será avaliado a atividade antimicrobiana e o efeito em linhagens tumorais, incluindo linhagens de osteosarcoma. As BiNPs foram sintetizadas e caracterizadas quanto as propriedades físico-químicas, por espectrometria UV/VIS confirmando a presença de BiNPs na solução coloidal, apresentando um pico plasmônico entre 250 – 260 nm. Já pelo espalhamento dinâmico da luz e microscopia eletrônica de transmissão foi constatado uma morfologia esférica e de tamanho heterogêneo. Na avaliação da ação antitumoral, até o momento, foram testadas as linhagens do câncer de mama (MCF7), melanoma (SK-MEL) e de leucemia (K562), sendo que as BiNPs só inibiram o crescimento de células da linhagem leucêmica, atingindo até 90% de inibição em 100 µg/mL. Perspectivas do trabalho envolvem confirmar o efeito antitumoral em outras linhagens leucêmicas, em linhagens de osteosarcoma, além de estudar o efeito na osteogênese in vitro e ação antimicrobiana. Desta forma, este projeto busca ampliar o conhecimento sobre a interferência de BiNPs em processos celulares, com enfoque na diferenciação osteogênica, além da prospecção de novas aplicações.

Mestrado

3/1/2020

Priscilla Fanini Wowk (orientadora) e Ana Luiza PAmplona Mosimann (coorientador a)

Infecção por Flavivirus: análise da expressão de mediadores inflamatórios no sítio da infecção

A migração celular é uma etapa essencial para o processo de vigilância, ativação e tolerância imunológica. Em infecções causadas por arbovírus, a resposta imune inicia-se no sítio de infecção com a ação de células residentes do tecido e produção de citocinas. As citocinas e quimiocinas são moléculas solúveis capazes influenciar nas etapas iniciais e desfecho da patogênese viral de acordo com a resposta e células imunes que ativam. Embora pertencentes a mesma família, o vírus da dengue (DENV) e vírus Zika (ZIKV) desencadeiam sintomas e respostas imunes particulares, com lacunas importantes no entendimento dos momentos iniciais da infecção. Portanto, este trabalho tem como objetivo analisar a viremia e expressão gênica das principais citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas nos momentos iniciais da infecção por DENV e ZIKV em modelo murino. Camundongos C57/Bl6 selvagens e knockouts para o receptor de interferon de tipo I foram inoculados (s.c.) na orelha com tampão fosfato-salino (PBS), lipopolissacarídeo (LPS), ZIKV, ou DENV. Após os tempos de 24 e 72 horas, os animais foram eutanasiados e o sangue, os tecidos das orelhas e linfonodos drenantes da face foram coletados. As amostras coletadas foram submetidas a extração de RNA pelo método Trizol/Clorofórmio. Posteriormente, as amostras de RNA serão submetidas à retrotranscrição e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para análise de expressão dos transcritos das citocinas IFN α , IFN β , IFN γ , TNF α , IL1 β , IL6, IL10, IL12, IL17, e quimiocinas CCL5, CCL2, CXCL1, CXCL2. Também será avaliada a viremia no sangue dos animais através da utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o genoma dos vírus estudados. Até o momento foram realizados os experimentos in vivo, as extrações de RNA das amostras, e etapas iniciais de padronização da RT-qPCR. Os próximos passos serão a obtenção das eficiências dos primers e realização das RT-qPCRs. Com a análise de expressão das citocinas em modelo murino espera-se observar padrões que complementem o entendimento do recrutamento de células que chegam ao local de infecção e que migram para os linfonodos, bem como associar a expressão desses marcadores à interface entre resposta imune inata e adaptativa.

Mestrado

2/1/2022

Dr. Marco Augusto Stimamiglio

Caracterização do comportamento de células-tronco cultivadas em hidrogel MatriXpec™ para o emprego na engenharia de tecidos de cartilagem

A cartilagem articular é um tecido altamente especializado, capaz de tolerar uma grande quantidade de estresse físico intenso e repetitivo, no entanto, sua capacidade de cura espontânea é restrita. Uma vez lesionado, as injúrias no tecido cartilaginoso tendem a se acumular e podem levar a quadros graves de doenças articulares como a osteoartrite. Diante desse cenário, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias para promover o reparo de tecidos cartilaginosos lesionados. O uso de biomateriais e a construção de arcabouços tridimensionais (3D) vem ao encontro dessa demanda clínica, possibilitando que células-tronco mesenquimais (CTM) sejam incorporadas aos processos de biofabricação de tecidos para o uso na medicina regenerativa. O objetivo do presente trabalho é caracterizar a dinâmica de comportamento das CTM cultivadas tridimensionalmente sobre o hidrogel MatriXpec™, um biomaterial comercial obtido a partir de tecido cartilaginoso descelularizado. O hidrogel MatriXpec™ foi avaliado quanto à sua ultraestrutura pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e capacidade de permitir a adesão e cultivo de CTM humanas derivadas do tecido adiposo. Estas avaliações foram feitas por marcações imunofluorescentes e ensaios de viabilidade celular por meio da quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de cultivo, respectivamente. Após polimerização, o hidrogel apresentou estrutura tridimensional fibrosa, justificada por sua composição colágena, a qual representa um ambiente mecânica e biologicamente similar ao encontrado pelas células no tecido cartilaginoso nativo. Foi possível verificar que as CTM aderem ao hidrogel e ocupam todos os planos do mesmo. Por fim, verificou-se que o hidrogel não possui efeito citotóxico e permite a manutenção dos cultivos celulares. O hidrogel MatriXpec™ demonstra ser um candidato promissor para o cultivo de células-tronco para aplicações no reparo de lesões cartilaginosas devido às suas possíveis propriedades condro-instrutoras. Como perspectiva, têm-se a avaliação da diferenciação cartilaginosa a partir de CTM cultivadas em MatriXpec™.

Mestrado

3/21/2022

Guilherme Ferreira Silveira

Vigilância epidemiológica de H1N1: predição de zoonoses emergentes com base no Paradigma de Estocolmo

O estudo de doenças emergentes tem seguido a linha teórica do neodarwinismo em que a colonização de um novo hospedeiro por uma linhagem de patógeno é viabilizada por uma novidade evolutiva que surge logo antes da colonização. O Paradoxo do Parasita, que expõe a divergência entre o observado e os pressupostos da máxima coespeciação para diversidade e diversificação de patógenos, representa uma das principais limitações da perspectiva evolutiva neodarwinista. Porém, o Paradoxo do Parasito, ou a disparidade entre o que é esperado pela dinâmica de coespeciação e o que é observado, demonstra a necessidade da busca por outras teorias. Como alternativa, o Paradigma de Estocolmo propõe o estudo evolutivo de interações parasita-hospedeiro com base na capacidade e oportunidade das linhagens, o que pode trazer uma perspectiva mais evolutivamente precisa de processos de emergência de zoonoses. O presente trabalho objetiva utilizar o Paradigma de Estocolmo como fundamento teórico para entender a possibilidade do surgimento de doenças emergentes de interesse médico. Especificamente, utilizando de uma análise de correspondência múltipla (ACM) associada a uma análise de cluster, objetiva-se distinguir genótipos de Influenza do subtipo H1N1 (Orthomyxoviridae) a partir de características descritivas da capacidade do vírus de colonizar hospedeiros e da oportunidade de transmissão entre hospedeiros, conforme proposto pelo Paradigma de Estocolmo, envolvendo dados como coincidência de hospedeiros colonizados e potenciais, e interface de contato entre hospedeiros.

Mestrado

2/26/2021

Alexandre Costa (orientador) Maria Julia Barison (Coorientadora)

Efeito da glicose na infecção por trypanosoma cruzi em modelos de cultivo bi e tridimensionais

Trypanosoma cruzi é o agente causador da doença de Chagas, uma infecção que pode se tornar crônica e induzir hipertrofia cardíaca. 16 milhões de brasileiros sofrem de diabetes, que é crônica e é fator de risco para doenças cardíacas. Pacientes chagásicos crônicos podem se tornar diabéticos ao longo da vida. Assim, é importante elucidar a fisiopatologia cardíaca desencadeada pelo T. cruzi nessas populações. Portanto, esta pesquisa tem como objetivo investigar a resposta fisiológica de cardiomioblastos 'normais' e 'diabéticos' durante a infecção por T. cruzi colombianas ou Dm28c. Para imitar o estado hiperglicêmico presente no diabetes, cardiomioblastos H9c2 foram cultivados em meio de alta glicose (células 'diabéticas') e baixa (células 'normais'). O modelo de infecção foi caracterizado em culturas de células 2D e 3D, obtidas pela técnica liquid overlay. A progressão das alterações celulares relacionadas à cardiomiopatia hipertrófica induzida por infecção foi estudada pelo aumento da área citoplasmática e acúmulo de proteínas extracelulares. Além disso, as análises foram investigadas usando microscopia de imunofluorescência, sistema de imagem Operetta CLS e o software Harmony. Resultados preliminares mostraram que a infecção de cardiomioblastos 'diabéticos' induz: (i) maior proliferação intracelular Colombiana e Dm28c (maior número de amastigotas/célula) quando comparados a cardiomioblastos 'normais' ($p=0,05$ e $p>0,001$, respectivamente), e (ii) aumento da área citoplasmática quando comparados a cardiomioblastos 'normais' ($p<0,01$) infectados por ambas as cepas. Além disso, a expressão de fibronectina foi maior em cardiomioblastos infectados do que em não infectados ($p<0,0001$) no primeiro dia de infecção e após três dias de infecção pela cepa Colombiana em esferóides, independentemente do meio de cultura. Em resumo, nossos dados mostram características da hipertrofia cardíaca chagásica em cardiomioblastos H9c2 após infecção por cepas de T. cruzi e sugerem que a hipertrofia induzida por Chagas pode estar sendo modulada pela condição glicêmica.

Mestrado

1/3/2022

Alexandre Dias Tavares Costa

DIFERENTES MÉTODOS MOLECULARES PARA AVALIAÇÃO DOS GENES HRP2 E HRP3 E SUAS DELEÇÕES EM PLASMODIUM FALCIPARUM

A malária é uma doença parasitária presente em todas as áreas tropicais do mundo, sendo a espécie *Plasmodium falciparum* a mais letal. A distribuição de testes de diagnóstico rápido (TDR) é uma ferramenta indicada como alternativa para o diagnóstico em áreas de difícil acesso. Estudos relatam que houve uma redução na eficiência dos TDR baseados na detecção dos genes *pfHRP2/pfHRP3*. Apesar da existência conhecida da diversidade genética, deleções de regiões destes genes foram identificadas e mostradas como as principais responsáveis pela perda da eficiência dos TDR, afetando o mapeamento e monitoramento de áreas endêmicas. Programas de controle da malária dependem de um diagnóstico confiável, e parasitas que possuem deleções representam uma ameaça ao controle e aos esforços locais de eliminação. Além disso, o uso extensivo de TDR podem levar a um aumento de resultados falso-negativo, criando pressão para uma varredura seletiva de linhagens de *P. falciparum* HRP2/HRP3- negativos. Nosso propósito é avaliar os métodos moleculares disponíveis para tentar identificar um método confiável para monitorar as deleções nos genes *pfHRP2/pfHRP3*. Serão analisadas 57 amostras pré caracterizadas para a presença ou deleção nos genes alvo usando diferentes técnicas de identificação (ópticas, sorológicas ou moleculares). O fragmento alvo do HRP2/HRP3 será amplificado por diferentes qPCR para avaliar a eficiência de cada uma delas. Os genes alvo serão sequenciados, assim como os genes flanqueadores e o gene classificador 18S rRNA de *P. falciparum*. As amostras também serão analisadas por ddPCR. Usando genes sintéticos, avaliamos as reações publicadas por Grignard et al. (2020), e obtivemos eficiência de 74% e LOD 868 moléculas/ μ L para o alvo HRP2 e eficiência 68%, e LOD 246 cópias/ μ L para o alvo HRP3. As reações baseadas em Kreidenweiss et al. (2019) mostraram eficiência de 79% para o alvo HRP2 e LOD 9 moléculas/ μ L. A análise por qPCR em amostras clínicas mostraram divergência de resultado com sua pré-caracterização, levantando a hipótese de deleções em regiões distintas das que cada reação qPCR avalia, sendo então necessário mais ensaios moleculares para esclarecer as dúvidas.