

Relatório Técnico-Científico e Administrativo

TÍTULO DO PROJETO: Missão técnico-científica do Laboratório de Biossegurança de Nível 3 do Núcleo de Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

RESUMO do Projeto

O SARS-CoV-2 foi responsável pela pandemia que tem afetado o mundo nos últimos três anos. As novas linhagens do vírus continuam a surgir preocupando o mundo com possível aumento nas taxas de transmissão, patogenicidade e escape imunológico das vacinas. O monitoramento das variantes de SARS-CoV-2 e outros potenciais microrganismos da classe de risco 3 de biossegurança é importante, para isso é necessário que tenhamos infraestrutura e pessoal qualificado para evitar o risco de contaminação nos espaços onde as pesquisas ocorrem. A Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (FAMED-UFC) está em fase final de construção de um laboratório de Biossegurança de Nível 3 (BSL-3) em seu Núcleo de Biomedicina (NUBIMED). Esta proposta visa enviar em missão técnica de curta duração uma equipe de professores, pesquisadores, técnico e administradores do NUBIMED para treinamento em manejo de microrganismos nível 3 de risco, cultura de células e organoides, genoma, metagenômica e metabolômica em laboratório BSL-3. Propomos que esse treinamento seja realizado na Universidade da Virginia (UVA), que tem sido instituição parceira da FAMED-UFC e NUBIMED em pesquisas da área de microbiologia médica há mais de 45 anos (NUBIMED – Núcleo de Biomedicina; <https://nubimed.ufc.br>). A equipe de pesquisadores na School of Medicine, University of Virginia (UVA), VA, USA, receberá o grupo de pesquisadores do NUBIMED para treinamentos em biossegurança, manejo de microrganismos em ambiente BSL-3, subcultivo de SARS-CoV-2 variantes, infecção de SARS-CoV-2 variantes em células e organoides humanos, e estudos em genômica, transcriptoma e metabolômica. O apoio da UVA neste treinamento é primordial, haja visto que o laboratório BSL-3 já conta com os modelos de infecção celular e animal por SARS-CoV-2 estabelecidos. Além disso, a UVA também conta com grande infraestrutura multiusuária de laboratórios e equipe de técnicos qualificados para a realização de todos os estudos envolvendo as ciências “ômicas”.

Introdução

O surgimento de novas linhagens SARS-CoV-2 intensificam o debate sobre a possível elevação da taxa de transmissão, patogenicidade e resistência às vacinas já disponíveis no Brasil e no Mundo. O surgimento de variantes mostra que é importante monitorar os vírus circulantes e isso não tem sido feito de maneira adequada no Brasil e no mundo. Precisamos fazer um esforço para coletar amostras e sequenciar o material genético desse vírus muito mais do que tem ocorrido, principalmente no Ceará e no Brasil. Alguns países realizam muitos sequenciamentos e sabem quais variantes do vírus estão circulando. No Brasil, ainda não fazemos isso na quantidade necessária. Há grupos sequenciando em São Paulo, Rio de Janeiro, Amazonas e Rio Grande do Sul, mas deveríamos fazer muito mais e de modo mais bem distribuído no país (FARIA et al., 2021, doi: [10.1126/science.abh2644](https://doi.org/10.1126/science.abh2644)). Devemos ter postos de vigilâncias distribuídos pelo país para coletar essas amostras e sequenciá-las para acompanhar a dinâmica de disseminação das variantes virais e seus potenciais de virulência.

É também necessário e de importância em saúde pública fazer os testes para monitorar se essas variantes virais são mais transmissíveis, patogênicas e capazes de escapar dos anticorpos induzidos pelas vacinas já disponíveis e em usos no Brasil. Ante tal contexto, é crucial o Estado do Ceará estabelecer investigação em vigilância epidemiológica, genômica, patogênese e propriedades antigênicas sobre o impacto do SARS-CoV-2 em saúde pública no Ceará. A criação no Estado do Ceará de um laboratório BSL-3 capaz de estudar a genômica de cepas virais do SARS-CoV-2, influenza e outros vírus de infecções respiratórias, com certeza anteciparia informações importantes de bases translacionais em medicina para prioridades de prevenção e

intervenções antecipadas em saúde pública ao nível estadual, nacional, além de propiciar a interação com redes de pesquisas nacionais e internacionais em cepas virais emergentes e reemergentes.

Nossas pesquisas sobre os vírus da influenza mostraram a importância de regiões tropicais como estuário para eclosão periódicas e regulares de novas cepas virais com propriedades antigênicas que escapam ao sistema imune natural do hospedeiro e das respostas vacinais com antígenos das cepas originais (FILHO et al., 2021, doi: [10.3201/eid2709.203791](https://doi.org/10.3201/eid2709.203791)). Recentemente, concluímos um ensaio clínico que avaliou a eficácia do tenofovir isolado ou em combinação com emtricitabina nos escores dos sinais e sintomas de pacientes com COVID-19 leve e moderada. Apesar de não ter encontrado efeito protetor dos medicamentos testados, estudos adicionais avaliaram o mecanismo inflamatório causado pela infecção de SARS-CoV-2 em pacientes com sintomas leves (ARRUDA et al., 2021, doi: [10.31488/EJRM.122](https://doi.org/10.31488/EJRM.122); CLEMENTINO et al., 2022, doi: [10.1002/jmv.27842](https://doi.org/10.1002/jmv.27842); GONDIM et al., 2023, doi: [10.1002/jmv.29044](https://doi.org/10.1002/jmv.29044)). Um segundo ensaio clínico com pacientes com COVID-19 leve e moderado em busca de determinar o efeito da N-acetilcisteína (NAC) isolado ou em combinação com bromexina (BMX) foi encerrado e publicado (PIRES NETO et al., 2023, doi: [10.33140/tmoa.01.02.004](https://doi.org/10.33140/tmoa.01.02.004)). NAC é uma substância redutora de ação complementar interceptora viral, já a BMX é um inibidor de protease viral. Pacientes estão sendo acompanhados em ambulatório e observa-se os escores dos sinais e sintomas clínicos da doença. Ainda no contexto da pandemia do SARS-CoV-2 desenvolvemos um kit para a detecção do vírus utilizando a técnica de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop de Transição Reversa (RT-LAMP). O kit SARS-CoV-2 RT-LAMP demonstrou sensibilidade, especificidade e precisão para detecção do vírus em amostras de swab nasofaringe (ARRUDA et al., 2021, doi: [10.31488/EJRM.122](https://doi.org/10.31488/EJRM.122); PIRES NETO et al., 2023, doi: [10.33140/tmoa.01.02.004](https://doi.org/10.33140/tmoa.01.02.004)).

Visando expandir essa área de patógenos emergentes, com o objetivo de preparar o Estado do Ceará a responder as necessidades atuais da pandemia e de futuras pandemias, e a recente instalação de um laboratório de Biossegurança nível 3 (BSL-3) na Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, antecipamos a necessidade de um treinamento qualificado de nossa equipe de pesquisadores e técnicos do Laboratório de Doenças Infecciosas em cuidados de biossegurança e bioproteção com microrganismos de risco 3. Desta forma, propomos neste projeto um treinamento na Division of Infectious Diseases and International Medicine, School of Medicine, University of Virginia, VA, que tem sido parceira de nosso grupo de pesquisa por mais de 45 anos (NUBIMED – Núcleo de Biomedicina; <https://nubimed.ufc.br>; Guerrant RL Notes from a Diarrhea DOC Copyright© 2022, ISBN: 979-8-8377-1772-7).

Objetivo geral

Esta proposta visa enviar em missão técnica de curta duração uma equipe de professores, pesquisadores e técnicos do NUBIMED (vide **Tabela de Pessoal** ao final nos **Anexos I e II**) para treinamento em manejo de microrganismos nível 3 de risco, cultura de células e organoides, genoma, metagenômica e metabolômica em laboratório BSL-3. O treinamento foi realizado na Universidade da Virgínia (UVA), que tem sido instituição parceira da FAMED-UFC e NUBIMED em pesquisas na área de microbiologia, farmacologia, biologia, genoma, ciência de dados, doenças infecciosas e pediatria, há mais de 46 anos (NUBIMED – Núcleo de Biomedicina; <https://nubimed.ufc.br>). A equipe de pesquisadores na School of Medicine, University of Virginia (UVA), VA, USA, recebeu o grupo de pesquisadores do NUBIMED para treinamentos em biossegurança, manejo de microrganismos em ambiente BSL-3, subcultivo de SARS-CoV-2 variantes / amostras piloto de rotavírus, em células e organoides humanos, e estudos em genômica, transcriptoma, metabolômica e proteômica. O apoio da UVA neste treinamento foi primordial, haja visto que o laboratório BSL-3 já conta com os modelos de infecção celular e animal por SARS-CoV-2 e outros vírus já estabelecidos. Além disso, a UVA também conta com grande infraestrutura multiusuária de laboratórios e equipe de técnicos qualificados para a realização de todos os estudos envolvendo as ciências “ômicas”.

Objetivos específicos

1. Infraestrutura e treinamento de pessoal em protocolos de funcionamento para Laboratórios de Biossegurança Nível 3;
2. Experimentação de cultivo *in vitro* utilizando o modelo de rotavírus em células IEC-6 e organoides;

3. Treinamento e experimentos com cepas bacterianas sensíveis e multidroga resistentes, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* no Laboratório Multiusuário de Transcriptoma, Metagenômica e Genoma;
4. Treinamento e experimentos com cepas bacterianas, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* no Laboratório Multiusuário de Análise Biomolecular;
5. Experimentos com tecidos intestinais de camundongos saudáveis e desnutridos induzidos por dieta padrão denominada MAL-ED no Laboratório Multiusuário de Biologia Espacial;
6. Desenvolvimento, modelagem, aprendizado de máquina e análise de megabanco de dados nacionais nas áreas de vírus da Influenza A e SARS-CoV-2 utilizando ciência de dados, computação e matemática; e
7. Treinamento administrativo para gerenciamento e manejo de Laboratório de Biossegurança Nível 3, gerenciamento, perspectiva e expansão do programa secular (46 anos) de colaboração internacional entre a Universidade Federal do Ceará e a Universidade de Virgínia.

Métodos e Resultados seguindo os objetivos específicos listados acima

1. Infraestrutura e treinamento de pessoal nos protocolos de funcionamento para Laboratórios de Biossegurança Nível 3;

Durante a nossa missão na Universidade da Virgínia (UVA), tivemos a oportunidade de conhecer o Plano de Biossegurança escrito para a UVA. O plano aborda e atende aos requisitos da Lei de Segurança de Saúde Pública e Preparação e Resposta ao Bioterrorismo de 2002 e 7 CFR Parte 331, 9 CFR Parte 121 e 42 CFR Parte 73 dos Estados Unidos. A partir daí também elaboramos o nosso Manual referente ao manejo e gestão do laboratório de biossegurança BSL-3 do bloco da Biomedicina da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Ceará (UFC). O Manual descreve as políticas e procedimentos a serem usados para garantir um ambiente seguro enquanto trabalha com sistemas regulamentados de DNA recombinante, microorganismos infecciosos, biotoxinas, culturas de células humanas e fluidos corporais humanos. Este documento deverá ser revisado quando ocorrerem alterações ou pelo menos anualmente pelo Investigador Principal e pelo Oficial Responsável para garantir que seja oportuno e preciso e deve estar disponível e acessível ao pessoal que acessa ao BSL-3.

Além do Manual, um Plano de Resposta a Incidentes também foi concebido a partir do treinamento e conhecimento recebido durante as duas visitas à UVA.

Esses documentos (Manual e Plano de Resposta a incidentes) estão disponíveis no site do Núcleo de Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, atual gestora do laboratório BSL-3 em questão, e poderá ser acessado através do link: www.nubimed.ufc.br/bsl3.

Na oportunidade da visita a UVA participamos de treinamento intensivo sobre segurança biológica no nível BSL-3, sob a orientação de Dave Clark, especialista em biossegurança associado. O treinamento abordou os aspectos críticos do manejo e construção de instalações BSL-3, com enfoque especial na importância de um sistema de inventário eficiente para o rastreamento de cepas, que poderia ser particularmente benéfico para as operações em Fortaleza. Dave enfatizou o processo de treinamento para acesso à instalação, apresentando-o como um modelo que poderíamos replicar em nossas instalações no Brasil.

Um componente vital deste treinamento foi a compreensão da lista de verificação de autorização MR6 BSL-3, que inclui a obtenção de um atestado médico específico para garantir a aptidão dos pesquisadores para o uso de equipamentos de proteção respiratória. Ademais, o treinamento em BSL-2 foi considerado um pré-requisito, cobrindo aspectos como patógenos transmitidos pelo sangue e segurança química. A formação incluiu uma orientação detalhada sobre a instalação, que consistiu em uma visita física ao local e discussão sobre a documentação necessária, assinaturas e certificações exigidas pelo governo federal, particularmente para aqueles trabalhando com patógenos selecionados. O treinamento prosseguiu com uma abrangente introdução aos conceitos de contenção em BSL-3 e regulamentações de agentes selecionados. Foram discutidos os requisitos de segurança biológica em relação a agentes que podem ser utilizados como armas bioterroristas, incluindo biossegurança e

relatórios de incidentes. Um entendimento profundo sobre o que constitui um bio-perigo, os níveis de contenção e as diretrizes estabelecidas para laboratórios microbiológicos e biomédicos foram explorados, ressaltando a importância dos controles administrativos, exigências de acesso, proficiência em BSL-3, vigilância médica, gerenciamento pós-exposição e procedimentos de autoidentificação de mudanças no estado de saúde.

Além disso, foram examinados os protocolos de exposição ao BSL-3, os riscos associados aos agentes registrados, e os sinais gerais e sintomas de cada agente. O desenho da instalação, incluindo requisitos de fluxo de ar e monitoramento visual, foram detalhados, juntamente com os requisitos de infraestrutura, como pias acionadas sem contato e métodos de descontaminação. Práticas de trabalho seguras, incluindo transporte de materiais contaminados e uso de equipamentos de proteção individual (EPI), como capuzes PAPR e uniformes Tyvek, foram meticulosamente revisadas.

Finalmente, a sessão cobriu a regulamentação e supervisão em níveis nacional, estadual, local e universitário, com ênfase nos planos de biossegurança baseados em avaliação de risco, planos de segurança, resposta a incidentes e requisitos adicionais para agentes de Nível 1. A necessidade de planos eletrônicos acessíveis e a importância de comunicação e documentação adequadas foram enfatizadas, ressaltando que, em caso de dúvida, a ação correta é sempre perguntar e lembrar que, se não está documentado, não aconteceu.

Este treinamento em BSL-3 foi não apenas instrutivo, mas também essencial para o desenvolvimento de práticas de biossegurança robustas e responsáveis em nossas instalações. Representa um passo significativo em direção ao estabelecimento e gerenciamento de uma instalação de BSL-3 em Fortaleza, equipando-nos com conhecimentos e habilidades críticas para realizar pesquisas de alto nível em um ambiente seguro e controlado.

Por fim, as visitas e treinamentos realizados durante a nossa missão UFC-UVA foi de extrema relevância para apoio a finalização estrutural e principalmente gestão da instalação BSL-3 em Fortaleza.

As nossas instalações contam com entrada com liberação por reconhecimento facial, espaços de antecâmara, vestiário e vestiário limpo, além de armários destinados a preparação e vestimenta dos EPIs. Dentro do BSL-3 contamos com alguns equipamentos como: freezers (-20°C e -80°C), geladeira, cabine de segurança microbiológica classe II, incubadora, centrífuga, agitador, banho maria, incubadora, Cytation10[®], computador. Neste website www.nubimed.ufc.br/bsl3 consta os detalhes das plantas e projeto executivo do laboratório BSL-3 da nossa unidade, utilizado para a sua construção e implementação.

Os mapas estruturais da construção e fotos do ambiente BSL-3 NUBIMED/FAMED, UFC, além de outras informações encontram-se disponíveis através do site www.nubimed.ufc.br/bsl3.

2. Experimentação de cultivo viral *in vitro* utilizando o modelo do rotavírus em cultura de células IEC-6 e organoides;

Este relatório descreve as atividades realizadas durante duas visitas de campo à University of Virginia (UVA), em Charlottesville, Estados Unidos, por uma equipe de pesquisadores da Universidade Federal do Ceará. Um dos focos da primeira visita foi o estudo e prática em cultura de células, organoides, e técnicas de subcultura viral.

Durante a primeira visita, que durou três semanas, a equipe participou de um treinamento intensivo em biossegurança e obteve autorização para trabalhar no laboratório de virologia da UVA. Sob a supervisão do professor Brett Moreau, focamos nos seguintes aspectos:

- a) Treinamento de Biossegurança: Antes de iniciar os trabalhos práticos, completamos um treinamento de biossegurança, essencial para garantir a manipulação segura dos materiais biológicos.
- b) Cultivo de Células e Organoides: Iniciamos com o cultivo de células MK1, células do epitélio renal de macaco, escolhidas pela sua relevância em estudos virológicos. A manutenção dessas células envolveu condições rigorosas de cultura, incluindo controle de temperatura, umidade, e CO₂, além de monitoramento regular e subculturas para evitar superpopulação.

- c) Técnicas de Subcultura Viral - O ponto focal da visita foi o aprendizado e aplicação de técnicas de subcultura viral. Os passos envolvidos foram:
- Subcultivo de Rotavírus: Utilizando células MK1, organizamos experimentos para subcultivar rotavírus. Este processo começou com o subcultivo das células por três dias, seguido pela infecção com o vírus por 24 horas.
 - Coleta e Análise do Sobrenadante Viral: Após a infecção, coletamos o sobrenadante viral para análise. A coleta foi feita após um período de incubação das células infectadas em placas de 6 poços.
 - Ensaio de Formação de Placa Viral: Realizamos um ensaio de formação de placa viral, que é crucial para quantificar a quantidade de partículas virais infecciosas presentes. Este ensaio permite a identificação e contagem de unidades formadoras de placa (PFU).
- Em mais detalhes o treinamento para Execução do Protocolo de Plaque Assay com Estoque de Rotavírus P2 aconteceu sob a instrução experiente do Dr. Brett Moreau e do Dr. Vinicius Alves. Nosso time de pesquisadores recebeu treinamento especializado na execução do protocolo de ensaio de formação de placa utilizando estoques de rotavírus P2. O treinamento abrangeu a preparação cuidadosa de células MA-104, com contagem de células viáveis utilizando Azul de Tripiano e o cultivo destas a uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço em uma placa de 12 poços. Fomos instruídos a preparar duplicatas para uma gama de diluições do estoque de rotavírus P2, incluindo controles positivos e negativos, assegurando-se de preparar volume suficiente de células para ambas as placas que seriam utilizadas no experimento. Além disso, aprendemos a preparar um novo estoque de tripsina e a importância de sua esterilização e alíquotação para evitar contaminação cruzada.

Durante o segundo dia, verificamos a confluência das células MA-104, preparando-as para a infecção viral. O treinamento enfatizou a necessidade de manipulação cuidadosa dos estoques de rotavírus, o descongelamento a temperatura ambiente, e a ativação do vírus com tripsina antes da incubação. Fomos ensinados a lavar as células com PBS estéril, adicionar meio EMEM sem soro e realizar diluições seriadas do vírus para as infecções. A prática abordou a aplicação rigorosa de uma sobreposição de Avicel em vez de agarose, uma técnica adaptada que anteriormente demonstrou sucesso com o SARS-CoV-2 e com rotavírus, conforme documentado por CHANG-GRAHAM et al., 2020, doi: [10.1126/science.abc3621](https://doi.org/10.1126/science.abc3621). Ao longo do experimento, a precisão na adição de vírus diluído e sobreposição de Avicel foi destacada como crítica para a obtenção de resultados consistentes e reprodutíveis.

Após o treinamento, prosseguimos com a execução e análise de resultados do Plaque Assay com estoque de Rotavírus P2. As células MA-104 foram incubadas até atingirem confluência completa e, em seguida, foram infectadas com as diluições preparadas do estoque de rotavírus P2. A adição da sobreposição de Avicel foi meticulosamente realizada para garantir uma distribuição uniforme sobre as monocamadas celulares. A importância de uma aplicação rápida e consistente foi reforçada para evitar a precipitação do Avicel. Após 48 horas de incubação, procedemos com a fixação e a coloração das placas utilizando uma solução de formaldeído a 10% e o corante violeta de cristal, respectivamente. A atenção aos detalhes durante o processo de fixação, lavagem e coloração foi crucial para visualizar claramente os plácidos e calcular os títulos virais em PFU/ml com precisão. As práticas e técnicas aprendidas durante o treinamento provaram ser indispensáveis na obtenção de dados confiáveis e na compreensão profunda da metodologia de ensaio de formação de placa.

Essas atividades proporcionaram experiência prática significativa em técnicas avançadas de cultura de células e virologia. A oportunidade de trabalhar em um ambiente de laboratório altamente especializado, sob a orientação de especialistas na área, foi inestimável para nossa pesquisa e desenvolvimento profissional.

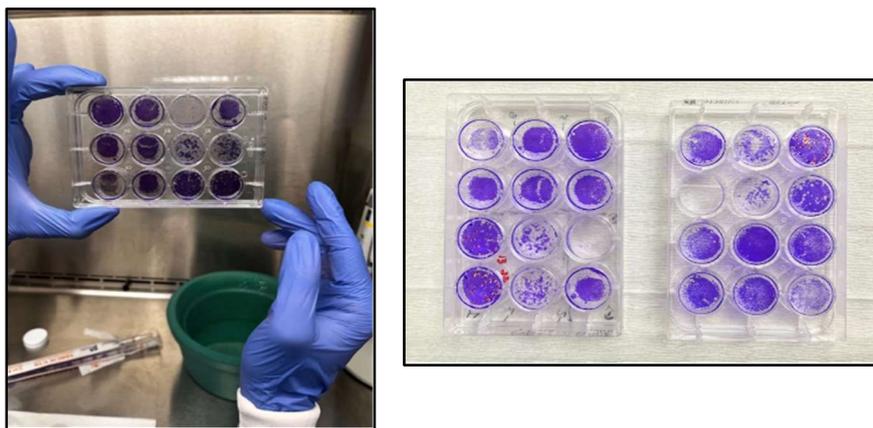


Figure 1. Resultado do Plaque Assay com estoque de Rotavírus P2. As células são visualizadas após fixação e coloração com solução de formaldeído a 10% e cristal violeta, respectivamente.

3. Treinamento e experimentos com cepas bacterianas sensíveis e multidroga resistentes, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* no Laboratório Multiusuário de Transcriptoma, Metagenômica e Genoma;

Durante a segunda visita, que durou duas semanas, concentrou-se no aprimoramento de habilidades em bioinformática, particularmente no uso do software R para análises de transcriptoma e metagenoma. Sob a orientação do Dr. Brett Moreau e da Dra. Georgia Breaussou, nossa equipe participou de sessões intensivas focadas nas seguintes áreas:

- a) Análises de Transcriptoma: Aprendemos a utilizar o R para analisar dados de transcriptoma, que envolve o estudo de conjuntos completos de transcritos (RNA mensageiro) em uma célula ou conjunto de células. As análises de transcriptoma são fundamentais para entender a expressão gênica e como ela é alterada em diferentes condições, como em doenças ou em resposta a tratamentos.
- b) Análises de Metagenoma: Também nos concentramos em análises de metagenoma utilizando R. O metagenoma refere-se ao estudo do material genético recuperado diretamente de amostras ambientais, permitindo uma compreensão mais ampla da diversidade microbiana e suas funções em diferentes ambientes.

Durante o treinamento com o Dr. Brett Moreau e a Dra. Georgia Breaussou. Elaboramos um código estruturado para realizar uma série de análises bioinformáticas, essenciais para o trabalho com dados de transcriptoma e metagenoma.

No treinamento, o primeiro passo foi a instalação de pacotes no R necessários para análises bioinformáticas e geração de gráficos, como rmarkdown, knitr, ggplot2, rafalib e pheatmap. Após a instalação, esses pacotes foram carregados na biblioteca para uso. Esse processo assegura que todas as funções necessárias estão disponíveis e prontas para executar as análises subsequentes. A instalação do BiocManager e pacotes relacionados, como airway, DESeq2, e org.Hs.eg.db, habilitou a análise de dados de sequenciamento de expressão gênica e anotação de genes. A utilização do conjunto de dados airway serviu como um exemplo prático, onde os participantes puderam explorar dados reais de sequenciamento e aplicar o conhecimento adquirido.

O código prosseguiu com a leitura e manipulação de dados de expressão gênica, e o uso de funções do pacote ggplot2 para visualizar a distribuição e variabilidade dos dados. A criação de gráficos de dispersão log-log das contagens médias de expressão gênica versus a variância demonstrou o relacionamento entre a expressão e a variação, uma etapa crucial para a normalização de dados em análises de RNA-Seq. O pacote DESeq2 foi utilizado para normalizar os dados de contagem de expressão gênica e realizar testes estatísticos para identificar genes diferencialmente expressos, uma parte central das

análises de transcriptoma. Filtros de ajuste de *p-valor* e limiares de mudança de dobra foram aplicados para refinar os resultados e identificar os genes mais significativos.

Por fim, o código abordou a visualização avançada de dados e a anotação de genes. A função *heatmap* foi usada para gerar mapas de calor dos genes mais expressivos, permitindo uma compreensão intuitiva dos padrões de expressão entre diferentes condições experimentais. Além disso, a integração com o banco de dados *org.Hs.eg.db* permitiu a associação dos identificadores de genes com seus símbolos e nomes, facilitando a interpretação biológica dos resultados. Este treinamento em R forneceu aos participantes as ferramentas necessárias para executar análises complexas de dados de expressão gênica, essenciais para a moderna pesquisa em biologia molecular.

A seguir focamos na normalização, análise e anotação de dados de expressão gênica. O código inicia carregando pacotes necessários, incluindo *ggplot2* para visualização de dados, *heatmap* para mapas de calor, *DESeq2* para análise de expressão diferencial, e *org.Hs.eg.db* para anotação de genes, juntamente com o *Biobase* e outros pacotes relevantes para a análise de dados de sequenciamento. O pacote *DESeq2* é utilizado para construir um conjunto de dados a partir do objeto *airway*, seguido pela execução da função *DESeq* para normalizar os dados e realizar análises estatísticas. As funções *estimateSizeFactors* e *sizeFactors* são usadas para normalizar os dados de contagem, um passo crucial antes de qualquer comparação estatística, garantindo que as variações técnicas entre as amostras sejam adequadamente contabilizadas.

Após a normalização, o código prossegue com a anotação de genes usando o pacote *org.Hs.eg.db*. Este passo associa identificadores de genes com símbolos conhecidos, nomes e IDs do Entrez, o que facilita a interpretação biológica dos dados. O script também demonstra como extrair e ordenar os resultados com base no ajuste dos valores *p*, seguido por uma seleção dos principais genes para análise subsequente. O código então ilustra como escrever os resultados ordenados em um arquivo CSV para compartilhamento ou análise futura.

Na segunda parte, o código aborda a leitura de um novo conjunto de dados de expressão gênica e a criação de histogramas para visualizar a distribuição dos dados de contagem. O código continua preparando os dados para a análise *DESeq2*, removendo colunas não necessárias e configurando metadados de amostra, que são essenciais para o design experimental da análise. O script segue com a execução de *DESeqDataSetFromMatrix* e *DESeq* para realizar a análise de expressão diferencial. A função *results* é utilizada com diferentes valores de alfa para filtrar genes com base em critérios de significância estatística e mudança de dobra.

Finalmente, o código mostra como identificar genes diferencialmente expressos sob condições experimentais específicas, usando limiares de *p-valor* e *log2FoldChange*. Uma vez identificados os principais genes, o código usa *heatmap* para visualizar padrões de expressão, proporcionando insights visuais sobre a dinâmica da expressão gênica. Este conjunto de ferramentas e métodos descritos é fundamental para a análise de dados de transcriptoma e metagenoma, permitindo aos pesquisadores descobrir novos insights biológicos e compreender melhor os mecanismos moleculares subjacentes às suas perguntas de pesquisa.

Após o estudo de transcriptoma elaboramos em um código de R um roteiro detalhado para análise de dados 16S rRNA, comumente utilizado para caracterizar e comparar comunidades microbianas em amostras ambientais e biomédicas. Este código específico foi projetado para ser usado durante um *workshop* prático, permitindo aos participantes acompanhar e aplicar cada etapa da análise de metagenômica.

4. Treinamento e experimentos nas áreas de metabolômica e proteômica dos meios intra- e extracelular utilizando cepas bacterianas, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinotobacter baumannii* no Laboratório Multiusuário de Análise Biomolecular;

O *Biomolecular Analysis Facility Core* (BAF) é um *Cancer Center Core* da Universidade da Virginia (UVA) e está empenhado em trazer o que há de melhor em instrumentação e pessoal. Os instrumentos incluem um ThermoFisher Exploris 480® e um ThermoFisher Orbitrap ID-X®. O Exploris 480® fornece alta resolução e alta precisão de massa em espectro (MS) e MS/MS. Este instrumento pode realizar análises

proteômicas e de proteínas intactas usando interfaces nLC e CE. A quantificação agora é realizada usando monitoramento paralelo de tração (PRM). O Orbitrap ID-X[®] fornece metabolômica de alta resolução e quantificação de pequenas moléculas. Esses dois instrumentos podem atender a todas as necessidades proteômicas e metabolômicas qualitativas e quantitativas. Também oferece um conjunto de instrumentos compartilhados para acesso aberto.

O BAF está agrupado em duas áreas: (1) Espectrometria de Massas – análise qualitativa e quantitativa de proteínas, peptídeos, metabólitos e pequenas moléculas; e (2) Instrumentação Compartilhada – equipamento operado pelo usuário ou análise assistida pela equipe. O BAF permite a: (a) Determinação precisa de massa via cromatografia líquida (LC) ou eletroforese capilar (CE) de pequenas moléculas, peptídeos e proteínas; (b) Análise de Misturas Simples ou Complexas; (c) Proteômica Comparada; (d) Análise de Modificações Pós-traducionais; (e) Quantificação do Monitoramento de Reações Paralelas (PRM); (f) Metabolômica não alvo; (g) Vias metabólicas alvo; (h) Rastreamento de Isótopos; (i) Interações Moleculares (Lei do Octeto); (j) Leitura de Placas; (k) Dicroísmo Circular; e (l) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC. O BAF tem como diretor o Professor Nicholas E. Sherman, Ph.D, e a Diretora Assistente Dilza Silva, Ph.D.

Evidências moleculares da resistência aos beta-lactâmicos em isolados de *Klebsiella pneumoniae* com foco na resistência a múltiplas drogas e na virulência (*medRxiv BMJ Yale preprint 2024*, doi: <https://doi.org/10.1101/2023.12.30.23300671>). *Klebsiella pneumoniae* está associada a alta resistência a antimicrobianos e é comum em isolados de colonizações e infecções nosocomiais. O estudo tem como objetivo detectar genes de resistência pertencentes a 23 famílias *bla* e investigar vias metabólicas em isolados de *K. pneumoniae*. Os genes das subfamílias 24 incluíram: *blaSHV*, *blaTEM*, *blaNDM*, *blaKPC*, *blaGES*, *blaCTX-M* e variantes relevantes da família *blaOXA sub-25*. Os dados de espectrometria de massa foram adquiridos no espectrômetro Orbitrap ID-X[®] (Thermo) conectado ao sistema 26 Vanquish UPLC. Isolados de 122 amostras de *K. pneumoniae* foram coletados de 23/04/2019 a 27/29/05/2021. Foi encontrada alta prevalência de resistência às penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos entre os isolados. O perfil genotípico identificado mostrou alta prevalência de genes pertencentes às 29 classes de beta-lactamases A, B e D de Ambler. No estudo metabolômico, o metabólito N-frutoseil isoleucina foi identificado aumentado em cepas multirresistentes (MDR) de *K pneumoniae* em comparação com cepas suscetíveis aos antimicrobianos. Conclui-se que os ensaios desenvolvidos foram eficientes na detecção dos principais genes da família *bla* de resistência em *K. pneumoniae*. O uso da via metabólica da pentose fosfato sugere a regulação do crescimento bacteriano, virulência e colonização em cepas MDR de *K. pneumoniae*.

5. Experimentos com tecidos intestinais de camundongos saudáveis e desnutridos induzidos por dieta padrão denominada MAL-ED no Laboratório Multiusuário de Biologia Espacial;

O Núcleo de Biologia Espacial (SBC) foi lançado em julho de 2022 no Centro de Saúde, Universidade de Virginia, para trazer o que há de mais moderno em pesquisas para o estudo das interações celulares e moleculares no contexto espacial de tecidos e órgãos. A análise espacial combinou sequenciamento de RNA espacial de célula única, microscopia de alta resolução e análise quantitativa de dados de imagem para permitir estudos de genômica espacial e proteômica em grande escala.

O SBC oferece experiência em perfil espacial de amostras biológicas. Técnicas e instrumentação fornecidas pela SBC podem ajudar a mapear a arquitetura espacial de células e tecidos. Experimentos de suporte central em transcriptômica espacial e proteômica espacial. A instrumentação inclui:

Análise Multiplex: (a) NanoString nCounter[®] - dados de expressão altamente reproduzíveis em mais de 800 alvos e painel personalizado; (b) IsoPlexis[®] - sistema ELISA *multiplex* de resolução de célula única, monitorando mais de 30 citocinas ao mesmo tempo.

Análise Espacial: (a) NanoString CosMx SMI[®] - Análise multiômica *in situ* de alta complexidade. Monitoramento de 64-120 proteínas e 1.000-6.000 transcrições em uma lâmina; (b) NanoString GeoMx DSP[®] [hospedado pelo BTRF Core] - fornece contexto morfológico em transcriptômica espacial e análise proteômica espacial; (c) ZellScanner[®] - ChipCytometry[®] - imagens de alta qualidade combinadas com *software* de imagem avançado permitem análises verdadeiramente quantitativas.

Imagem de alto conteúdo: (a) Sistema de imagem de alto conteúdo Perkin Elmer Operetta CLS® - Imagem confocal e não confocal -8 LEDs Excite. O núcleo da SBC é dirigido pelo Dr. Jay Fox, Ph.D. e Dra. Ana Karina de Oliveira, Ph.D. (ak4yj@virginia.edu). O treinamento piloto no SBC resultou na ideia seminal para processar amostras de tecido do intestino jejunal de camundongos saudáveis e desnutridos induzidos com dieta para desnutrição denominada MAL-ED desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa em um projeto com suporte do CNPq (No. do processo: 426032/2018-7; UNIVERSAL 2018 Relatório; Ribeiro Tese de Doutorado 2022; Ribeiro et al. 2023, doi: [10.1017/S0007114522001271](https://doi.org/10.1017/S0007114522001271); Maciel et al., 2021, doi: [10.1093/jn/nxaa271](https://doi.org/10.1093/jn/nxaa271)). Neste estudo será relevante a avaliação da barreira funcional do epitélio jejunal no intestino das interações celulares e moleculares no contexto espacial do tecido epitelial. Em adição, iremos estudar o sistema imune da submucosa jejunal do intestino através de dados de expressão altamente reproduzíveis em mais de 800 alvos e de alvos celulares para monitoramento de mais de 30 citocinas ao mesmo tempo.

6. Desenvolvimento, modelagem e análise de megabanco de dados nas áreas de vírus da Influenza e SARS-CoV-2 utilizando ciência de dados, computação e matemática

Projeto influenza nacional Brasil 2013-2018:

A vacinação contra influenza em mulheres grávidas tem demonstrado reduzir o número de nascimentos prematuros. Trabalhos mostram que a influenza sazonal no Ceará, semiárido do Brasil, ocorre de 2 a 3 meses antes do Sul e Sudeste. Apesar disso todo o Brasil está sujeito ao mesmo esquema de vacinação. Portanto mulheres grávidas e seus fetos são inadequadamente protegidos contra influenza nas regiões tropicais e equatoriais do Brasil. Testaremos a hipótese de que a atual política nacional de vacinação da influenza no Brasil, utilizando a vacina do Hemisfério Sul, protege inadequadamente contra os efeitos materno-fetais prejudiciais de baixo peso ao nascer caracterizado por peso inferior a 2500 gramas e prematuridade caracterizada por nascimento com menos de 37 semanas. O estudo observacional descritivo será desenvolvido para analisar as séries históricas de registros de síndrome respiratória aguda grave no Brasil, no período de 2013 a 2018. A **Figura 2** resume os dados de síndrome respiratória aguda grave (SRAG) e período vacinal contra influenza no Brasil em 2018. A população de estudo corresponderá aos registros de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN-Influenza), no período de 2013 a 2018, que fazem parte do estudo INFLUEN-SA Brasil. Os dados que alimentam o sistema SINAN-Influenza, foram coletados a partir da ficha de registro individual, destinada para unidades com internação por síndrome respiratória aguda grave (SRAG), de pessoas hospitalizadas ou óbito por SRAG. Será utilizada como fonte de dados secundária, os dados do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC) que contém informações epidemiológicas referentes aos nascimentos informados no Brasil. Esta base de dados fornecerá informações sobre o parto de mulheres grávidas ou puérperas com ou sem registro de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG). Os dados do banco de dados SINASC foram coletados a partir do Formulário da Declaração de Nascido Vivo. As mães serão divididas em dois grupos. O primeiro grupo será composto por crianças nascidas de mães que tiveram notificação de SRAG durante a gravidez com registro de SRAG no sistema SINAN com correspondente registro do nascimento no sistema SINASC. O segundo grupo será composto pelos registros de crianças com registro de nascimentos no sistema SINASC, selecionadas aleatoriamente, pareadas por idade mais ou menos três meses de idade, cuja mães não tinham registros de SRAG durante a gravidez no sistema SINAN. A análise dos dados será feita a partir de uma tabela de dados com informações do sistema SINAN-Influenza. Uma segunda tabela será feita a partir de informações referentes as informações de parto de grávidas ou puérperas provenientes do banco de dados SINASC. E uma terceira tabela combinando as duas tabelas anteriores em uma única tabela contendo informações dos registros de SRAG e dados sobre o nascimento de crianças onde as mulheres grávidas ou puérperas apresentavam ou não registro de SRAG provenientes do sistema SINAN-Influenza. Devido ao grande número de registros do sistema SINASC, será usado o *software* de banco de dados MySQL versão 5.0.11 para este gerenciamento. O pacote estatístico R versão 3.6.2 for Windows e *software* Stata Versão 11 também foram usados para

formatação das tabelas. A análise estatística será realizada usando o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Statistics for Windows, Versão 20.0, IBM Corporation, Armonk, NY). Todas as amostras e dados dos sujeitos do estudo foram analisados anonimamente. O teste de *Shapiro-Wilk* será utilizado para avaliar a normalidade dos dados variáveis quantitativas e o teste de Levene para avaliar a igualdade das variâncias. O teste de *Mann-Whitney* (dois grupos) será utilizado para variáveis cuja distribuição não for normal. As variáveis qualitativas serão analisadas pelo teste do qui-quadrado ou teste de *Fisher*. O software GraphPad Prism, versão 3.0 para Windows (San Diego, CA, EUA) será utilizado para análises complementares e delineamento das figuras.

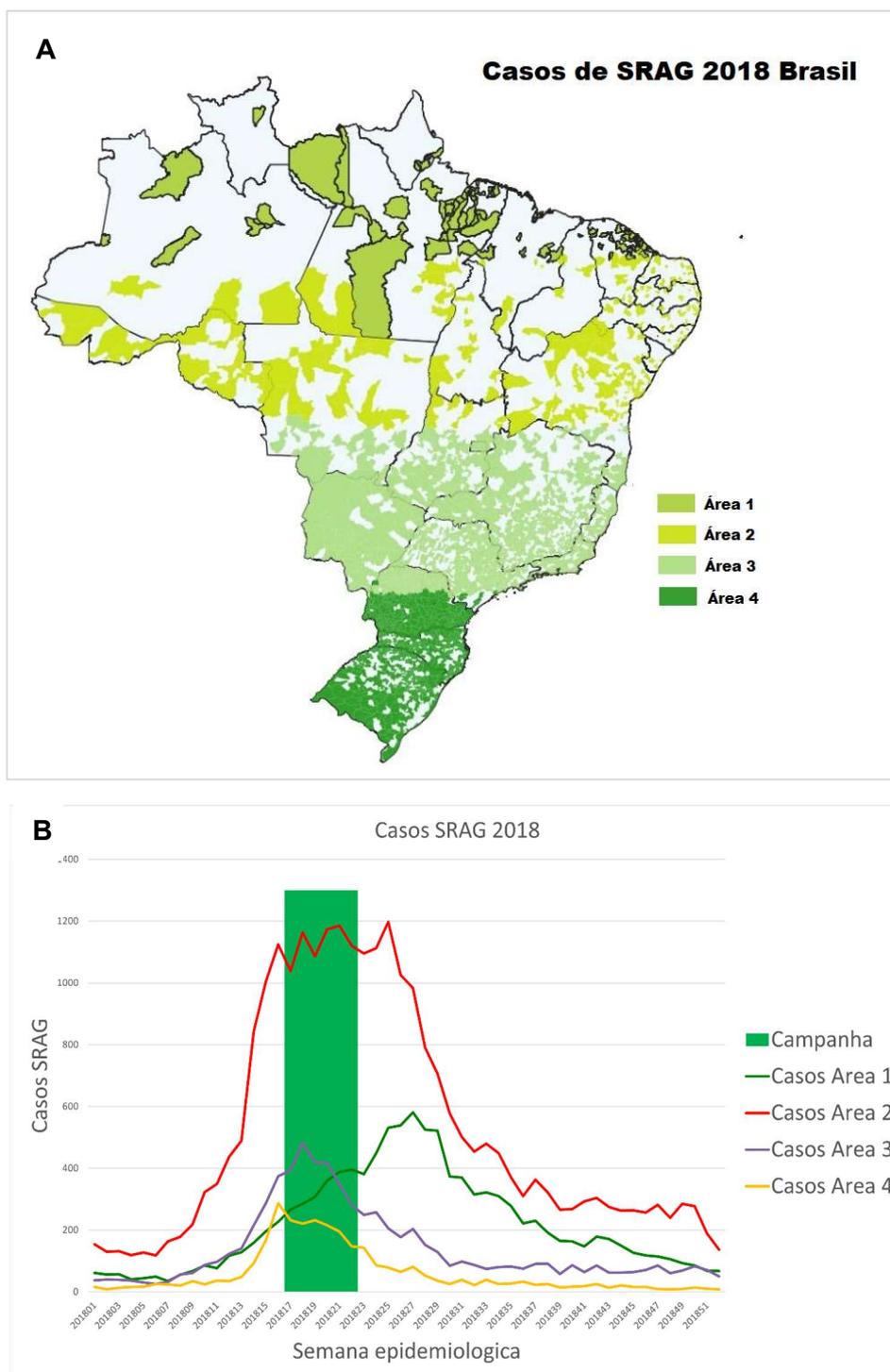


Figura 2 – Mapeamento dos casos de síndrome respiratória aguda grave (SRAG) nas áreas geográficas do mapa do Brasil (**A**) e por semana epidemiológica mostrando também o período vacinal contra influenza no ano de 2018 (**B**).

Projeto COVID-19 – Ceará 2020-2022:

O vírus SARS-CoV-2 é o agente etiológico da doença COVID-19 e responsável pela pandemia de coronavírus. Originou-se na China para um número crescente de países (LAYNE et al., 2020, doi: [10.1126/scitranslmed.abb1469](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb1469); LI et al., 2020, doi: [10.1056/nejmoa2001316](https://doi.org/10.1056/nejmoa2001316)). Até abril de 2022, foram confirmados no mundo mais de 521 milhões de casos, com mais de 6 milhões de mortes. No Brasil foram confirmados mais de 30 milhões de casos, com mais de 600 mil mortes. O Ceará registrou 1,2 milhões de casos, com mais de 26 mil óbitos. Como este é o primeiro contato com o vírus SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, é muito importante analisar seu impacto nos desfechos materno-fetais. O objetivo geral é analisar o impacto entre os casos de COVID-19 em mulheres grávidas e os desfechos materno-fetais no estado do Ceará entre os anos de 2020 e 2022. Objetivos específicos são descrever as características clínico-epidemiológicas dos casos de COVID-19 em mulheres grávidas. Comparar os dados clínicos-epidemiológicos entre casos com diagnóstico laboratorial confirmado e descartado para SARS-CoV-2. Avaliar a severidade da COVID-19 de acordo com sintomas e morbidades pré-existentes. E analisar o impacto dos efeitos materno-fetais prejudiciais de baixo peso ao nascer (<2500 gramas) e prematuridade (nascimento <37 semanas). Para o estudo proposto utilizaremos duas bases de dados. A base SINAN-Influenza e Sivep-Gripe, que são notificações ao sistema de vigilância de internações por Síndrome Respiratória Aguda Grave. Essa será a fonte de dados epidemiológicos e clínicos de mulheres grávidas. A segunda base será o registro de nascimentos do sistema SINASC-DATASUS. Essa será a fonte de informações sobre o parto e dados do nascimento. As variáveis serão agrupadas por características sociodemográficas, epidemiológico-clínicas e laboratoriais. Serão utilizadas análises de correlação e regressão logística para determinar a existência de associação entre a COVID-19 e desfechos materno-fetais. Os resultados poderão fornecer informações relevantes sobre o impacto da COVID-19 nos desfechos materno-fetais.

7. Treinamento administrativo para gerenciamento e manejo de Laboratório de Biossegurança Nível 3, gerenciamento, perspectiva e expansão do programa secular (46 anos) de colaboração internacional entre a Universidade Federal do Ceará e a Universidade de Virginia.

Descritiva relativo a segunda missão técnico-científica do Laboratório de Biossegurança de Nível 3 do Núcleo de Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará e a *School of Medicine, Medical Center, University of Virginia* (UVA), Charlottesville, VA, USA para expansão e consolidação na colaboração em pesquisas entre a UFC & UVA.

A missão do setor administrativo do NUBIMED/FAMED-UFC representado pelos colaboradores Kátia M. L. Nogueira e Charles R. S. Melo, no período de 16 a 24 de outubro de 2023 teve como propósito visitar a infraestrutura da UVA, bem como dar continuidade ao convênio existente entre a Universidade Federal do Ceará e a Universidade da Virgínia. A missão teve como grande relevância o contato com o administrador executivo do *Child Health Research Center* (Sr. Jalen O. Hill), onde foi trocado experiências e aprendizagens relacionadas a administração dos Laboratórios Multiusuários:

- a) Unidade de ciências de dados, computação, matemática e estatística;
- b) Biorepositório e biobanco de amostras, microorganismos, células e tecidos;
- c) Laboratório de análise biomolecular;
- d) Laboratório de genoma, transcriptoma e metagenômica;
- e) Laboratório de microscopia eletrônica molecular;
- f) Laboratório de citometria de fluxo e biologia espacial;
- g) Laboratórios multiusuários BSL3 / BSL2 / BSL1: replicação viral (vírus entéricos e respiratórios), patobiologia e desenvolvimento de fármacos;
- h) Laboratório de iniciativa interinstitucional em microbioma.

Em seguida fomos apresentados a diretora assistente de infraestrutura de pesquisa e administração de empresas (Sra. Ewa Kubicka), que nos mostrou o funcionamento e logística do núcleo de tecnologia e análise de genoma.

Conhecemos o trabalho desenvolvido da assistente administrativa sênior da divisão UVA de doenças infecciosas e saúde internacional (Sra. Samantha A. Moreau), onde atua na administração de escritório, operações, coordenação de eventos, recursos humanos, treinamentos e suporte tecnológico.

Tivemos a oportunidade de ter o contato virtual com a gerente sênior do programa de pesquisa (Sra. Casandra L. Hoffman), que tem o papel relevante de ajudar os codiretores a gerenciar a iniciativa *TransUniversity Microbiome*, onde percebemos a sua importância no gerenciamento junto aos pesquisadores de *CORE's*.

ANEXOS

Anexo I

Lista dos membros de pesquisadores e técnicos da 1ª. Missão BSL-3 na Universidade da Virginia, VA.

Legal First Name	Department or School	User Email Address	Job Title	Start Date	End Date
Aldo Ângelo Moreira Lima	Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil	alima@ufc.br	Professor at UFC	20/05/2023	08/06/2023
Alexandre Havt Binda	Department of Physiology and Pharmacology	ahavt@ufc.br	Associate Professor at UFC	20/05/2023	08/06/2023
Jose Quirino Silva Filho	IBIMED - Instituto de Biomedicine - UFC	jqf_ce@yahoo.com.br	Data manager at UFC	20/05/2023	08/06/2023
Lyvia Maria Vasconcelos Carneiro Magalhães	Department of Physiology and Pharmacology	lyviacarneiro@ufc.br	Pharmacist at UFC	20/05/2023	08/06/2023
Marco Antônio de Freitas Clementino	IBIMED - Instituto de Biomedicine - UFC	mclementino@ufc.br	Visiting Professor at UFC	20/05/2023	05/06/2023
Rafhaella Nogueira Della Guardia Gondim	Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil	rafha.dellaguardia@gmail.com	Postdoctoral Researcher at UFC	20/05/2023	08/06/2023

Anexo II

Lista dos membros de pesquisadores e técnicos da 2ª. Missão BSL-3 na Universidade da Virginia, VA.

Legal First Name	Department or School	User Email Address	Job Title	Start Date	End Date
Aldo Ângelo Moreira Lima	Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil	alima@ufc.br	Professor at UFC	16/10/2023	27/10/2023
Alexandre Havt Binda	Department of Physiology and Pharmacology	ahavt@ufc.br	Associate Professor at UFC	16/10/2023	27/10/2023
Bruna Leal Lima Maciel	Federal University of Rio Grande do Norte, Brazil	bruna.maciel@ufrn.br	Professor at UFRN	16/10/2023	24/10/2023
Charles Roberto Sousa Melo	IBIMED - Instituto de Biomedicine - UFC	filhonego@yahoo.com.br	Admin Staff at NUBIMED-UFC	16/10/2023	24/10/2023
Jose Quirino Silva Filho	IBIMED - Instituto de Biomedicine - UFC	jqf_ce@yahoo.com.br	Datamanager at UFC	16/10/2023	27/10/2023
Katia Maria Lima Nogueira	IBIMED - Instituto de Biomedicine - UFC	katianog1@yahoo.com.br	Admin Staff at NUBIMED-UFC	16/10/2023	24/10/2023
Lyvia Maria Vasconcelos Carneiro Magalhães	Department of Physiology and Pharmacology	lyviacarneiro@ufc.br	Pharmacist at UFC	16/10/2023	27/10/2023
Marco Antônio de Freitas Clementino	IBIMED - Instituto de Biomedicine - UFC	mclementino@ufc.br	Visiting Professor at UFC	16/10/2023	27/10/2023
Rafhaella Nogueira Della Guardia Gondim	Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil	rafha.dellaguardia@gmail.com	Postdoctoral Researcher at UFC	16/10/2023	27/10/2023