

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROCESSOS SELETIVOS PARA MESTRADO E DOUTORADO 2023

Prova de Escrita de Conhecimentos - Valor 100,00

Atenção: Respeitar o limite de caracteres para responder a cada questão, conforme especificação.

Com base no Artigo 1 intitulado “*Triacylglycerol synthesis enhances macrophage inflammatory function*” DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17881-3> responda às questões seguintes:

Questão 1. Células que exibem o fenótipo “espuma” são frequentemente associadas a várias condições patológicas como infecções, doenças metabólicas, cardiovasculares e câncer. Acredita-se que elas se formam quando o conteúdo lipídico dos macrófagos excede a sua capacidade de manter a homeostase lipídica e leva a uma reprogramação da função imune. Assim, quando a homeostase lipídica é alterada há a formação de corpos lipídicos (LD - lipid droplet) no citoplasma. Este mecanismo levou muitos grupos a proporem que estas células fossem um alvo para tratamento farmacológico de doenças. Castoldi et al. buscaram investigar o processo e o significado funcional da síntese de triacilglicerol na resposta ao estímulo pró-inflamatório mediado por LPS e IFN-gama. Os resultados são mostrados na Figura 1a.

Discuta os resultados apresentados na Figura 1a. VALOR: 10

Resposta: *Macrófagos em repouso e inflamatórios (estimulados com IFN-gama e LPS) tiveram seu RNA total extraído para estudo de expressão gênica pela técnica de RNASeq. Uma lista de genes diferencialmente expressos (DEG) foi obtida e usada para gerar uma figura de heatmap. Os autores destacam que os genes Dgat1, Dgat2 e Gpat3 ($p < 0,001$) foram up-regulated em macrófagos inflamatórios quando comparado com macrófagos em repouso como parte de um programa transcricional amplo de genes envolvidos na síntese de triacilglicerol em resposta ao estímulo por LPS + IFN-gama. Gpat3 foi o gene mais up-regulated. 1a*

Questão 2. Castoldi et al. mostram que a inibição da enzima DGAT-1, o passo final da síntese de TAG, em macrófagos estimulados com LPS+IFN- γ previne a produção de mediadores inflamatórios como IL-1 β , IL-6 e PGE2, bem como a capacidade fagocítica dos macrófagos. Os autores concluem que a falta de PGE2 é crítica para inibição das demais respostas, uma vez que a reposição com PGE2 exógena reverte os efeitos anti-inflamatórios do inibidor de DGAT-1.

A) Com base nos resultados apresentados no artigo e em seu conhecimento da via, a reposição com ácido aracídico (AA) exógeno poderia apresentar efeitos semelhantes à reposição com PGE2 exógena? Explique. **VALOR: 10**

Resposta: Considerando a via de produção da PGE2, a suplementação com AA poderia apresentar efeito semelhante. O AA é substrato da enzima COX-2 no macrófago, sendo convertido em PGH2 por ação desta enzima e posteriormente em PGE2 por ação da PGE sintase. No entanto, como observado na Figura 4 do artigo, os níveis da enzima PGE-sintase (gene Ptges) se encontram reduzidos nos macrófagos pré-tratados com inibidor de DGAT-1, de modo que o AA exógeno pode não apresentar efeito por não ser metabolizado até PGE2.

B) Além dos experimentos apresentados no artigo, que outro(s) experimento(s) poderia(m) ser realizado(s) para atestar a participação da PGE2 nos efeitos anti-inflamatórios do inibidor de DGAT-1 em macrófagos ativados com LPS+IFN- γ ? **VALOR: 10**

Resposta: Em contrapartida à reposição da PGE2, outra abordagem possível é a inibição deste mediador ou da via metabólica que o produz. Algumas alternativas estão disponíveis: inibição da enzima COX-2 usando aspirina (AAS), inibição dos receptores prostanóides E (EP1 a EP4) responsáveis pela sinalização de PGE2 e até mesmo o silenciamento de genes envolvidos em tal via, como COX-2, PGE-sintase ou receptores EP. Experimentos com macrófagos estimulados com LPS+IFN-gama na presença do inibidor de DGAT-1 ou na presença de AAS poderão identificar os efeitos comuns das duas drogas, dissecando quais os componentes da programação anti-inflamatória observada que dependem das vias de produção de PGE2.

Questão 3. Durante o metabolismo de Warburg há um alto consumo de glicose por células cancerígenas com síntese e acúmulo de lipídeos. Esta reprogramação metabólica é compartilhada pelo mesmo grupo de sinais em células da resposta inflamatória. Um dos genes relacionados a esta resposta relaciona-se às acil-CoA:diacilglicerol aciltransferases 1 e/ou 2 (DGAT1,2). Ambos encontram-se *up-regulated* em células estimuladas por LPS e IFN gama. Qual o mecanismo genético que explica esse compartilhamento e uma maior contribuição de DGAT1 nessa função? **VALOR: 10**

Resposta: *Os genes regulados são dependentes de fatores gerais da transcrição e fatores específicos da transcrição. Nesse caso, ambos os genes devem pertencer a uma mesma família, assim ambos são considerados isoformas variantes por duplicação. Como são variantes do mesmo gene e a expressão de DGAT1 é maior como mostrado na figura 1a provavelmente tem seus fatores secundários da transcrição tem maior afinidade pelas moléculas sinalizadoras de ambos os processos.*

Com base no Artigo 2 “*Transcriptomic and proteomic analysis of Staphylococcus aureus response to cuminaldehyde stress*” DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109930> responda às questões seguintes:

Questão 4. Os autores utilizaram métodos de transcriptômica e proteômica para analisar a resposta de *Staphylococcus aureus* exposto a uma condição de estresse.

- a) Explique as diferenças entre essas duas estratégias de análise e discuta a importância do controle da expressão gênica bacteriana, do ponto de vista de sobrevivência às condições adversas. VALOR: 10

Resposta: A transcriptômica e a proteômica são estratégias utilizadas para analisar o fluxo da expressão gênica. A transcriptômica é o estudo do transcriptoma, ou seja, corresponde ao conjunto de todas as moléculas de RNA expressas em um organismo sob determinada condição. A proteômica é o estudo do proteoma, ou seja, corresponde ao conjunto de todas as proteínas expressas por um organismo sob determinada condição. Sob condições adversas ou condições de estresse, as células bacterianas respondem prontamente a essa nova condição alterando a expressão de genes de forma coordenada, ou seja, inibindo genes que codificam proteínas que não apresentam um papel importante naquele momento e aumentando a expressão de genes que codificam proteínas fundamentais para adaptação e sobrevivência à nova condição. O controle da expressão gênica bacteriana pode acontecer em diferentes níveis: controle transcricional, pós transcricional, traducional e pós traducional, o que garante uma resposta rápida e precisa.

Questão 5. Cuminaldeído (CUM) é um composto com fórmula molecular C₁₀H₁₂O e é um dos principais constituintes dos óleos essenciais de cominho, eucalipto, mirra, cássia e outros. O seu uso comercial é principalmente na indústria de cosméticos. O conhecimento tradicional empírico tem associado o óleo essencial a propriedades de interesse de saúde como antifúngico, antibacteriano e antioxidante. Por outro lado, tem havido uma busca e acúmulo de evidências científicas que sustentam a hipótese de que o óleo essencial, e mais especificamente o CUM, apresenta propriedades antibacterianas. Desvendar os mecanismos de ação dos compostos e propor uma utilização para fins aplicados é uma área instigante. Li et al. (2022) propõe um mecanismo de resposta de *S. aureus* sob exposição a CUM a partir dos seus resultados e de outros estudos prévios. O mecanismo de resposta de *S. aureus* ao CUM é proposto pelos autores na Figura 5.

a. Os autores propõem que *S. aureus* responde ao CUM ativando genes e proteínas da via de reparo ao DNA. Quais são os resultados apresentados no artigo que sustentam esta afirmação? VALOR: 10

Resposta: *A Tabela 2 apresenta os genes diferencialmente expressos (DEGs) e proteínas (DEPs) frente à exposição ao CUM. Tanto os dados de transcriptoma e os de proteômica mostram que os genes dnaC, dnaD, mustS2 tem o fold-change de 3,65, 0,38 e 0,06 (transcriptoma) e 2,57, 1,0, 2,92 e 1,71 (proteômica) respectivamente. Estes genes/proteínas estavam, portanto “up-regulated”. Todos estes genes estão envolvidos com a função de reparo do DNA. Os autores afirmam que apesar de alguns outros genes (transcriptoma/ proteômica) terem a sua expressão diminuída durante a exposição, com a subunidade alfa da DNA polimerase III (-1,86), a atividade total da função reparo de DNA estava “up-regulated”.*

b. Outro mecanismo de resposta proposto foi com relação à integridade celular. Quais são os genes e as proteínas envolvidos nessa via regulatória e os resultados apresentados? VALOR: 10

Resposta: *Os resultados são mostrados na Tabela 2 e os genes envolvidos são o murA2, murB e murF. Esses três genes/ proteínas estão envolvidos na biossíntese de peptidoglicano que é o principal componente na parede celular de bactérias gram-positivas como *S. aureus*. Os dados apresentados mostram que sob exposição de CUM o fold change foi 0,15, -0,06, -0,06 (transcriptoma) e -1,04, -0,99 e -0,77 para os genes (*murA2, murB e murF*)/ proteínas (MURA2, MURB E MURF). Outro gene/ proteína afetado foi o *lpl9/LPL9* que teve o fold change reduzido para -1,25 tanto com relação aos dados de transcriptoma como os de proteômica. Outros genes que suportam o mecanismo proposto são *ponA, sepF, ktrC, accC1, acpP e BCCP1* com dados de transcriptoma e proteômica apresentados na Tabela 2.*

Questão 6. O estudo acima mostrou que 258 genes foram diferencialmente expressos, ao passo que 384 proteínas foram diferencialmente expressas. Todavia, o número de transcritos detectados foi de 2453 genes e 1318 proteínas, compartilhando 754 proteínas e seus respectivos transcritos. Considerando esses dados responda:

- a) O que você entende por genes e proteínas diferencialmente expressos? **VALOR: 10**

Resposta: Diferencialmente expressos são genes e produtos de genes que são expressos apenas em um tecido quando comparado a outro ou um tipo de tecido submetido a condições experimentais ou ambientais diferentes de seu par sob condições diferentes.

- b) Considerando que todo peptídeo que compõe uma proteína é oriundo de um gene, cite motivos que podem explicar essa diferença. **VALOR: 10**

Resposta: *O splicing alternativo é uma explicação, visto que um mesmo gene pode gerar mais de uma proteína diferente, todavia a explicação mais plausível é a de que esse composto tem forte interação com proteínas e dessa forma atua em reguladores da transcrição diminuindo ou incrementando a expressão gênica. Dessa forma, essa interação também explica sua interação com enzimas e proteínas alterando seu funcionamento. Cabe ressaltar que o artigo cita a degradação rápida de proteínas, migração para outros tecidos ou ainda baixa concentração das mesmas.*

Questão 7. No estudo realizado por Li et al. foi demonstrado que o tratamento de cuminaldeído (CUM), composto majoritário do óleo essencial do cominho, pode regular negativamente algumas proteínas, entre elas os transportadores ABC. De acordo com os autores, esses transportadores estão associados a vários processos biológicos dentro da célula bacteriana. Com base nos resultados obtidos no paper, explique como a regulação negativa destes transportadores pode afetar a sobrevivência da célula bacteriana e consequentemente levar a danos na membrana de *S. aureus*? Além disso, faça uma associação entre as alterações nas vias do metabolismo energético com o funcionamento desses transportadores ABC. VALOR: 10

Resposta: Os transportadores ABC podem transportar uma variedade de substratos, como monossacarídeos, oligossacarídeos, íons inorgânicos, aminoácidos, sideróforos, metais e vitaminas, envolvidos principalmente na absorção de nutrientes, na saída de toxinas bacterianas e substâncias nocivas. Além disso, o baixo nível de proteínas da família de transportadores ABC mostra que é difícil obter os aminoácidos e íons inorgânicos necessários para manter a pressão osmótica da célula, o que pode estar associado ao dano na membrana de *S. aureus*. Desta forma, esses achados sugerem que o CUM poderia interferir no sistema de transporte e danificar gravemente a membrana de *S. aureus*. Os transportadores ABC utilizam ATP (se ligam ao ATP) para realizar o transporte de substâncias, logo alterações que conduzam a uma inibição de vias relacionadas com a produção de ATP, poderiam levar a alterações funcionais desses transportadores.