

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROCESSOS SELETIVOS PARA MESTRADO E DOUTORADO 2/2023

Prova de Escrita de Conhecimentos - Valor 100,00

Com base no Artigo 1 “*Gestational diabetes is driven by microbiota-induced inflammation months before diagnosis*” DOI: [http:// dx. doi. org/10. 1136/ gutjnl- 2022- 328406](http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2022-328406), responda às questões seguintes:

Questão 1. Considere as afirmações abaixo sobre os diversos modelos e estratégias experimentais usados no artigo de Pinto et. al. 2023: **(VALOR 5)**

- A) Estudo de coorte prospectivo com inclusão no primeiro trimestre e seguimento até o terceiro trimestre de gestação.
- B) Análise global do microbioma e metaboloma intestinal em amostras de fezes.
- C) Análise de marcadores bioquímicos, hormônios e mediadores inflamatórios no sangue.
- D) Transplante de fezes do primeiro trimestre de gestação para camundongos *germ-free*.
- E) Modelo computacional com *machine learning* para prognóstico da diabetes gestacional com base em dados clínicos, nutricionais, mediadores inflamatórios e microbioma.

Responda:

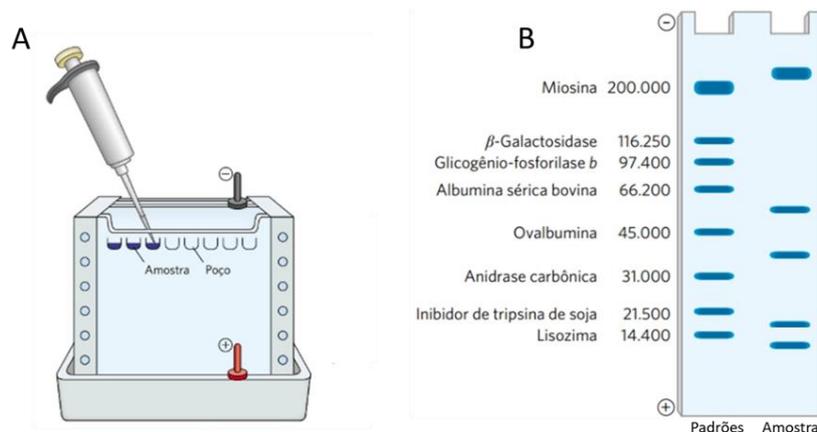
a) Os autores demonstram que alterações da microbiota suportam um quadro inflamatório que precede o desenvolvimento de diabetes gestacional. Qual das afirmações acima melhor descreve o modelo que permite concluir a relação temporal entre exposição (disbiose e inflamação) e desfecho (diabetes gestacional) : A .

b) Os autores mostram uma correlação entre disbiose, metaboloma intestinal e inflamação sistêmica no primeiro trimestre de gestação que foi associado ao desenvolvimento de diabetes gestacional *a posteriori*, e concluem que as alterações na microbiota induzem a inflamação e consequente desfecho clínico. Qual das afirmações acima apresenta o modelo que suporta a relação de causa e consequência nessa conclusão: D .

Questão 2 - A aplicação da inteligência artificial em medicina é uma área fascinante e que deverá revolucionar a saúde humana. A IBM é uma empresa americana fundada em 1911- e que tinha como principal negócio a venda de equipamentos de informática, sendo a primeira empresa a comercializar um computador para uso pessoal. Apesar de todo este domínio e liderança, a IBM mudou o seu portfólio de negócios e passou a investir pesadamente em inteligência artificial com foco em segurança, educação e saúde, dentre outros usos. O *IBM Watson Health* oferece soluções para cardiologia, apoio à decisão clínica, imagiologia etc. Semelhante às soluções propostas pela IBM, Pinto et al., 2023 utilizaram técnicas de inteligência artificial para prever a diabetes gestacional. É correto afirmar que: **(VALOR 5)**

- A) Os dados de transcriptoma do intestino delgado melhoraram a habilidade de prever diabetes gestacional no segundo trimestre.
- B) Os dados genômicos dos pacientes do estudo foram capazes de fornecer informações acuradas para predição de diabetes gestacional no primeiro trimestre.
- C) Os autores usaram a estratégia de aprendizado de máquina para prever diabetes gestacional no primeiro trimestre com base nas informações de marcadores bioquímicos e inflamatórios, observações clínicas e dados da microbiota. **(CORRETA)**
- D) Os autores usaram dados sobre os perfis de citocina, composição da microbiota, histórico alimentar para construir o modelo de aprendizado de máquina de 66 mulheres no terceiro trimestre gestacional.

Questão 3 - Pinto et. al., 2023 utilizaram a quantificação de citocinas no sangue das pacientes por meio da técnica de Multiplex. Outra técnica bastante utilizada para a quantificação de proteínas é a eletroforese. Sua vantagem é que as proteínas podem ser visualizadas, bem como separadas, permitindo ao pesquisador estimar rapidamente o número de proteínas diferentes em uma mistura ou o grau de pureza de uma preparação proteica específica. Você se propõe a analisar uma mistura de proteínas das amostras de fezes das gestantes usando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. Inicialmente, a amostra de proteína é tratada com o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*) antes de ser aplicada ao gel. O SDS liga-se fortemente às proteínas via adsorção, desnaturando-as completamente, as quais adquirem carga negativa e o gel foi submetido a um campo elétrico conforme esquema abaixo. Em (A) segue o esquema de seu experimento e, em (B), o resultado de sua amostra e de padrões que você utilizou e seus respectivos pesos moleculares. **(VALOR 5)**



Fonte: adaptado de NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. Peso molecular dos padrões dados em kDa.

A respeito da técnica utilizada e do resultado obtido de seu experimento, podemos afirmar que:

- a) As moléculas de proteínas foram atraídas pelo campo elétrico, migrando em direção ao polo positivo. Elas estão sendo separadas com base na massa. Quanto maior a molécula, mais difícil se torna para ela locomover pelo gel. O experimento permitiu estimar os pesos moleculares das proteínas da amostra. **(CORRETA)**
- b) As moléculas de proteínas foram atraídas pelo campo elétrico em função de suas respectivas cargas, algumas migrando em direção ao polo negativo e outras em direção ao polo positivo. Também, houve separação pelo peso molecular, devido à atração gravitacional. Nenhuma das proteínas da amostra é uma daquelas utilizadas como padrão.
- c) As moléculas de proteínas foram atraídas pelo campo magnético. Elas foram separadas com base na massa, e o efeito gravitacional é nulo. Quanto maior a molécula, mais difícil se torna para ela a migração. Uma das proteínas da amostra possui peso molecular menor que o da ovalbumina, mas maior do que o da anidrase carbônica.
- d) As moléculas de proteínas foram atraídas pelo campo magnético, sendo separadas pela sua carga. Além disso, puderam ser separadas de acordo com seus respectivos tamanhos, por efeito gravitacional. Moléculas dotadas de carga negativa tendem a se deslocar para a base do gel, enquanto as menores possuem maior dificuldade para migração.
- e) As moléculas de proteínas foram atraídas pelo campo elétrico, migrando em direção ao polo negativo. Elas estão sendo separadas com base na massa. Quanto menor a molécula, mais difícil se torna para ela locomover pelo gel. Após o experimento foi possível identificar pelo menos uma das proteínas da amostra.

Questão 4 - Observe as afirmativas abaixo em relação à figura 3 e marque V ou F. O uso de camundongos transplantados serviu para mostrar que camundongos *germ free line* recipientes do conteúdo fecal de mulheres no primeiro trimestre de gestação. (VALOR 5)

- a) reduziu a população de *P. cupri* em relação ao controle (V)
- b) manteve proporcionalmente as mesmas espécies de bactérias (F)
- c) promoveu uma maior intolerância à glicose peritoneal (V)
- d) aumentou as citocinas IL6 e IL10 (V)

Questão 5. Os autores propõem que os níveis elevados de IL-6 induzidos pelas alterações da microbiota intestinal no primeiro trimestre estão potencialmente envolvidos na patogênese da diabetes gestacional. Que experimento(s) poderia(m) ser realizado(s) para atestar a participação da IL-6 nesse modelo? (VALOR 15)

Para determinar o papel da IL-6 na patogênese da diabetes gestacional induzida por alterações da microbiota intestinal no primeiro trimestre, pode-se fazer o transplante de fezes para camundongos *germ-free* que também sejam *knockout* para o gene da IL-6 ou do receptor da IL-6 (IL-6R), avaliando se a ausência desses genes previne a intolerância à glicose induzida pela transferência da microbiota. Outra alternativa seria tratar os camundongos recipientes da microbiota do primeiro trimestre com antagonistas ou anticorpos neutralizantes contra IL-6 ou IL-6R, ou o silenciamento gênico a partir de RNA de interferência.

No modelo de humano, seria possível tratar as gestantes sob risco de desenvolver diabetes gestacional com o anticorpo monoclonal recombinante contra IL-6-R clinicamente aprovado tocilizumab, e avaliar o desenvolvimento da diabetes gestacional em comparação com o grupo placebo, desde que devidamente aprovado por comitê de ética em pesquisa e obtido consentimento assinado das participantes.

Questão 6: Os frutos de uma espécie vegetal distribuída na Mata Atlântica são utilizados popularmente para a prevenção do diabetes mellitus tipo 2. Já existem alguns estudos preliminares na literatura científica que buscaram fornecer evidências científicas de seu uso tradicional. Para contribuir com novos dados a respeito da planta em questão, você se propõe avaliar, ao longo de suas pesquisas no PPGCBio, a capacidade do extrato etanólico dos frutos da referida espécie vegetal na prevenção do diabetes gestacional. Sua pesquisa está sendo financiada por agência de fomento estadual e por entidade privada sem fins lucrativos interessada no desenvolvimento de novo produto biotecnológico passível de patenteamento e comercialização. Após a leitura do artigo em questão, proponha ao menos um experimento pré-clínico para iniciar a avaliação da possível atividade biológica desse extrato na prevenção do diabetes gestacional. **(VALOR 15)**

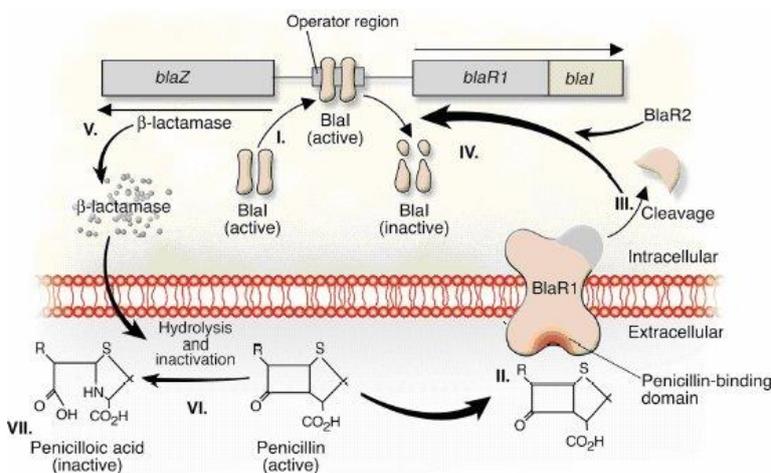
Uma possibilidade seria realizar o próprio transplante de fezes para animais de experimentação fêmeas germ-free não grávidas a partir de mulheres com o fenótipo de diabetes gestacional no primeiro trimestre da gravidez. No sétimo dia após o transplante, poder-se-ia dividir os animais em três grupos: (1) grupo veículo, que receberia um pré-tratamento antes do transplante, por exemplo, via oral do veículo utilizado para solubilização do extrato, (2) grupo teste, que receberia o pré-tratamento, por exemplo, via oral do extrato etanólico da planta em questão, e (3) grupo controle, que poderia ser tratado com uma substância de referência, como a própria insulina i.p associada à controle dietético e/ou exercício. Um quarto grupo interessante poderia ser um que recebesse o tratamento com o extrato vegetal mais o tratamento dietético e/ou exercício. Durante os dias subsequentes, poder-se-ia avaliar os níveis plasmáticos de biomarcadores para o diabetes gestacional identificados pelos autores do artigo, como a própria glicemia e citocinas, principalmente a citocina IL-6 (embora fosse interessante também avaliar IL-4, IL-8, IL-10, GM-CSF e TNF- α , encontradas em níveis elevados em pacientes com diabetes gestacional em comparação com gestantes saudáveis). Poder-se-ia, ainda, extrair os ácidos graxos de cadeia curta fecais e, por cromatografia gasosa, investigar os níveis de isovalerato e isobutirato, que provavelmente estarão reduzidos em animais com o fenótipo da doença em comparação ao grupo teste caso o extrato tenha atividade biológica. Ademais, poder-se-ia realizar a extração do DNA bacteriano fecal seguido de amplificação da região V4 do rRNA 16S, seguido do sequenciamento, para identificação da proporção de bactérias do gênero Prevotella, visto que poderá estar reduzido nos animais com o tratamento com veículo em comparação ao grupo teste, caso o extrato vegetal tenha atividade biológica. Finalmente, poderiam ser dosados no soro os aminoácidos alanina, fenilalanina e tirosina, cujos níveis elevados também estão associados à depleção de insulina. Outra possibilidade seria talvez realizar o pré-tratamento e induzir o diabetes gestacional em animais de experimentação fêmeas, como ratos ou camundongos, através da aplicação em excesso de estrógeno, um inibidor da ação da insulina envolvido na gênese do diabetes gestacional, durante a sua gestação; uma vez identificado o diabetes gestacional pelo teste de tolerância à glicose intraperitoneal, proceder-se-ia com a investigação dos biomarcadores citados acima seguida da comparação entre os grupos.

Com base no Artigo 2 “*Penicillin resistance in bovine Staphylococcus aureus: Genomic evaluation of the discrepancy between phenotypic and molecular test methods*” DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22158>, responda às questões seguintes:

Questão 7: *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno tanto para saúde animal quanto para saúde humana. Sendo, um dos principais causadores da mastite que é uma infecção na glândula mamária de mamíferos. Essa doença tem grande impacto no bem-estar e na saúde de animais, causando grandes perdas econômicas na produção de leite de bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos. *S. aureus* é encontrado normalmente na pele e na mucosa de animais, sendo hábil em sobreviver neste ambiente e é transmitido via ar, contato entre animais, secreções etc. Estudos baseados em análises genômicas têm mostrado que há uma origem comum entre alguns isolados de humanos e animais de produção, principalmente bovinos. E esse é um ponto de preocupação em saúde pública uma vez que pode haver uma disseminação de resistência bacteriana entre linhagens de *S. aureus* e outros micro-organismos. Com relação aos mecanismos de propagação natural da resistência bacteriana, assinale a alternativa INCORRETA. (VALOR 5)

- A) Mutação induzida (INCORRETA)
- B) Transformação (CORRETA)
- C) Transdução (CORRETA)
- D) Conjugação (CORRETA)
- E) Transposição (CORRETA)

Questão 8 – O sistema operon *bla* e de *S. aureus* pode ser considerado do tipo controle negativo induzível conforme o esquema abaixo: (VALOR 5)



Observando a Figura 1 do artigo de Ivanovic et al. 2023 é possível concluir que o promotor mutante por deleção:

- a) Promove uma transcrição constitutiva dos genes *blaZ* e *blaR1*.
- b) Impede a síntese de mRNA do gene *blaZ* tornando-a susceptível à penicilina. **(CORRETA)**
- c) Impede a ligação do Ribossomo (RBS) e não produz a enzima b-lactamase.
- d) Impede a ligação da DNA polimerase tanto para o gene *blaZ* quanto do gene *blaR1*.
- e) Promove a ligação estável do repressor *blal* ao operador gene *blaZ* tornando-a susceptível.

Questão 9: A resistência bacteriana aos antibióticos é determinada pela expressão de genes de resistência que, individualmente ou em conjunto, determinam o funcionamento dos mecanismos de resistência, associados a alterações nas maquinarias bioquímicas e/ou estruturais que promovem falhas no mecanismo de ação do antibiótico. As bactérias podem expressar resistência intrínseca (inerente), ou seja, mecanismos de resistência naturais de um gênero ou espécie bacteriana; ou podem expressar resistência adquirida, ou seja, aquela originada a partir de mutações nos próprios genes ou pela aquisição dos genes de resistência de outras bactérias. São mecanismos de resistência: **(VALOR 5)**

I – Produção de enzimas que degradam antibióticos: enzimas que degradam antibióticos são produzidas pelas bactérias e os inativam pela catálise hidrolítica das moléculas dessas drogas. Dentre as principais enzimas que degradam antibióticos estão as beta-lactamases que, como o próprio nome diz, atuam catalisando a hidrólise do anel beta-lactâmico.

II – Redução da permeabilidade da membrana externa: as bactérias gram-negativas são intrinsecamente menos permeáveis a muitos antibióticos por possuírem membrana externa na constituição de sua parede celular, o que não existe na parede celular de bactérias gram-positivas. Dessa forma, a redução da permeabilidade da membrana externa é um mecanismo de resistência exclusivo de bactérias gram-negativas.

III – Sistemas de efluxo hiperexpressos: os sistemas de efluxo são mecanismos naturais de excreção de substâncias tóxicas resultantes do metabolismo bacteriano, que se localizam na parede celular das bactérias e, geralmente, são codificados por genes no cromossomo. Clinicamente, a resistência pode ocorrer quando esses sistemas têm sua expressão aumentada (hiperexpressão).

IV – Alteração do sítio de ligação do antibiótico: a maioria dos antibióticos liga-se especificamente a um ou mais alvos na célula bacteriana. Alterações na estrutura do alvo do antibiótico impedem a eficiente ligação ou diminuem a afinidade dessa interação, desse modo o antibiótico não reconhece mais o alvo na célula bacteriana. Essas alterações impedem a ligação dos antimicrobianos, mas não interferem na função do alvo (ex.: proteína) alterado. Assim, a bactéria mantém suas funções e escapa da ação dos antibióticos.

- a) Apenas I, II e III estão corretas.
- b) Apenas II, III e IV estão corretas.
- c) Apenas I, II e IV estão corretas.
- d) Apenas I, III e IV estão corretas.
- e) I, II, III e IV estão corretas. **(CORRETA)**

Questão 10. Ivanovic et. al. 2023 encontraram resultados discrepantes entre os dados de resistência antimicrobiana por difusão em disco, concentração inibitória mínima e PCR para os operons *blaI*, *blaR1*, *blaZ*. Após sequenciamento do genoma completo, os autores concluíram que tal discrepância se deve à presença de uma mutação no operon *bla* (deleção de 31 pares de base) que o torna inativo. Com base no seu conhecimento sobre a técnica de PCR, explique como o operon *bla* incompleto ainda pode ser detectado por esta técnica gerando resultados conflitantes. **(VALOR 10)**

A técnica de PCR se baseia na amplificação de um fragmento de DNA por ação de uma enzima polimerase que duplica tal sequência a partir de fragmentos iniciadores (denominadas *primers*) que flanqueiam a sequência do gene (ou operon) a ser amplificado. Como os *primers* cobrem apenas as extremidades do operon *bla*, a presença de uma deleção de 31 pares de base no interior do operon não impede a amplificação pela PCR, que acusará resultado positivo, mesmo o operon não sendo funcional. Já o sequenciamento do genoma completo, mostrará diferenças na sequência do operon, incluindo mutações de deleção ou substituição.

Questão 11: A penicilina é um antibiótico usado comumente para tratamento de infecções intramamárias em bovinos. Entretanto, há o relato de várias linhagens resistentes a esse antimicrobiano. Para um efetivo tratamento, é necessário um adequado diagnóstico para determinação da sensibilidade do isolado ao antibiótico. Entretanto, os métodos utilizados para acessar essa resistência têm mostrado resultados discrepantes. Com o objetivo de determinar qual a melhor metodologia para determinar a resistência em *S. aureus*, Ivanovic et al., 2023 utilizaram métodos moleculares e fenotípicos em um grande número de linhagens isoladas de casos de bovinos leiteiros. Eles concluíram que a resistência à penicilina é altamente dependente da funcionalidade do promotor do operon *blaI*. Baseado nesse resultado, os autores recomendaram um método. Qual foi o método recomendado e que resultados suportam esta recomendação? **(VALOR 10)**

O método recomendado pelos autores foi o MIC. Eles verificaram que quando o promotor do operon *blaI* estava funcional as linhagens resistentes apresentavam valores de MIC ≥ 1 ug/mL. As linhagens susceptíveis apresentavam o promotor mutado. Esses dados são mostrados na Tabela 5 que traz os dados de caracterização genômica e fenotípica.

Questão 12 - Ivanovic et al., 2023 utilizaram diferentes técnicas para determinar qual o melhor método para avaliar a resistência de *S. aureus* à penicilina, como o ensaio de microdiluição em caldo e o teste de difusão em disco. Explique a diferença entre ambos os métodos. (VALOR 15)

O ensaio de microdiluição em caldo responde qual a concentração necessária de um antimicrobiano em particular para inibir o crescimento microbiano (MIC – concentração inibitória mínima), de maneira que quanto menor o MIC, maior a potência da droga e, quanto maior a potência, maior a dificuldade da bactéria em desenvolver resistência. Normalmente, o MIC é calculado realizando-se uma diluição seriada em placas de 96 poços. A determinação do crescimento bacteriano pode ser realizada visualmente, verificando quais os poços possuem e quais não possuem turbidez; ou pode-se lançar mão de espectrofotometria. De acordo com os autores do artigo, para valores de MIC iguais ou maiores a 0.25 mcg/mL quando utilizada penicilina, o micro-organismo é considerado resistente a esse antibiótico.

Já o princípio do teste de difusão em disco é diferente: o método baseia-se na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel-filtro em uma concentração fixa, ao contrário do ensaio de microdiluição. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano; quanto maior o halo de inibição, maior a sensibilidade do micro-organismo ao antibiótico testado. Esse método é meramente qualitativo, ou seja, permite classificar a amostra bacteriana em suscetível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano. Os autores ressaltam que um micro-organismo pode ser considerado sensível à penicilina se o halo apresentar-se igual ou maior a 26 mm, de acordo com o comitê europeu (EUCAST). Ainda, conforme os autores, o protocolo de difusão em disco da CLSI preconiza a concentração fixa de penicilina no disco de 10 UI, enquanto o protocolo do comitê europeu em 1 UI.