

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROCESSOS SELETIVOS PARA MESTRADO E DOUTORADO 3-2023

Prova de Escrita de Conhecimentos - Valor 100,00

Com base no Artigo 1 “*SARS-CoV-2 ORF8 Mediates Signals in Macrophages and Monocytes through MyD88 Independently of the IL-17 Receptor*” DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2300110> responda às questões seguintes:

Questão 1. São características da proteína ORF8 e do gene *ORF8*: **(2 PONTOS)**

A. O gene *ORF8* codifica uma proteína multifuncional que é altamente detectada em pacientes infectados com SARS-CoV-2 que apresentam sintomas severos e médios.

Resposta: FALSO. *SARS-CoV-2 open reading frame 8 (ORF8)* codifica uma proteína multifuncional que é altamente expressa na doença severa e pacientes infectados com o vírus que apresenta *ORF8* deletada exibem sintomas médios.

B. A proteína ORF8 modula a resposta imune pela regulação da expressão de MHC.

Resposta: VERDADEIRO. A proteína ORF-8 tem múltiplos papéis no curso da infecção, incluindo modulação da resposta imune pela regulação da expressão de MHC.

C. Células tratadas com a proteína recombinante His-ORF8 induz a expressão dos genes *IL6*, *IL1B*, *Cxcl1* e 2 em monócitos.

Resposta: VERDADEIRO. Na Figura 2A a 2C pode ser visto que quando diferentes tipos celulares foram tratados com His-ORF8 a expressão dos genes testados (*IL6*, *IL1B*, *Cxcl1* e 2) aumentou e foi similar a dos tipos celulares tratados com LPS, enquanto que os tratados com IL-17 não teve a expressão dos genes aumentada.

D. A proteína recombinante His-ORF8 induz a expressão em altos níveis de *IL6*, *IL1B*, *Cxcl1* e 2 em queratócitos murinos.

Resposta: FALSO. Na Figura 2D pode ser visto que as células queratócitos humanos tiveram o nível de expressão aumentado dos genes *IL6*, *IL1B*, *Cxcl1* e 2 quando foram tratadas com IL-17 mas quando foram tratadas com His-ORF8 o nível de expressão não foi significativamente maior. Não foram utilizados queratócitos murinos.

Marque V (verdadeiro) ou F (falso) para cada uma das alternativas acima e justifique as suas escolhas com base nos resultados apresentados no artigo.

Questão 2. Considerando a informação de que “o gene *ORF8* codifica uma proteína multifuncional que é altamente expressa na doença grave, e pacientes infectados com mutantes virais deletados de *ORF8* exibem sintomas amenos”, proponha sua utilização como alvo para desenvolvimento de uma vacina ou medicamento para o controle dessa doença. **(2 PONTOS)**

Resposta: A proteína ORF8 poderia ser utilizada para compor uma vacina contra a covid 19 grave. Nesse caso, os indivíduos seriam protegidos não contra a infecção, mas contra a gravidade da doença. Essa vacina poderia ser utilizada para induzir a produção de anticorpos (estimular a resposta imune humoral) ou para ativar a resposta celular.

No caso de uma vacina com função humoral, as principais células envolvidas são os linfócitos B. Esses linfócitos podem ser ativados por uma proteína recombinante ou por peptídeos sintéticos de porções imunogênicas da proteína levando-os à produção de anticorpos de várias classes, incluindo IgG. Os linfócitos B de memória são importantes para responder rapidamente ao imunógeno em reexposições. Os ac produzidos em resposta a uma vacina de caráter humoral poderiam atuar de diferentes formas: opsonizando o vírus e impedindo sua entrada na célula hospedeira, reduzindo assim a carga parasitária, atuando via sistema complemento), induzir via porção Fc a ativação de monócitos/macrófagos á fagocitose e a liberarem moléculas capazes de inativar o vírus.

No caso de uma vacina com função celular: Para uma proteção baseada em estímulo da resposta imune celular, diversas estratégias vacinais podem ser usadas, desde vacinas de mRNA, vetor viral ou subunidade proteica. Qualquer uma das estratégias visa a interação com células dendríticas que internalizam o antígeno e produzem epítomos da proteína alvo capazes de interagir via MHC de classe I e II com os linfócitos T CD4 e TCD8. Os linfócitos TCD4 por sua vez podem produzir IFN-gama que ativa macrófagos, linfócitos TCD8, células NK e a produção de IgG2a por linfócitos B, além de gerar células de memória. Já, a ativação de células TCD8, vai culminar na ativação do perfil citotóxico, que lisa as células infectadas, promovendo uma diminuição da infecção. Aliado a isso, essas estratégias levam a produção de células TCD8 de memória, fundamentais para a proteção de longo prazo.

Ainda, o gene poderia ser utilizado como alvo para terapias relacionadas ao RNAi (RNA de interferência). Nesse caso, a RNAs de interferência poderiam ser utilizados para silenciamento do gene ORF8 tornando as pessoas susceptíveis a infecção resistente ao agravamento

Questão 3. No estudo de Ponde et al., foram utilizados queratinócitos para entender a resposta a IL-17. Com base nisso marque a alternativa correta: **(0,5 PONTOS)**

- a) Os queratinócitos respondem igualmente a macrófagos/ monócitos;
- b) **Os queratinócitos respondem a IL-17 mas não responde ao ORF8;**
- c) Os queratinócitos não mostram níveis elevados de IL6 e IL1 β em resposta ao IL-17;
- d) ORF8 induz o aumento significativo dos genes de citocinas proinflamatórias.

Questão 4. Com base nas informações do texto fornecido sobre o SARS-CoV-2 e a proteína ORF8, explique como ela está envolvida na indução de respostas inflamatórias em monócitos e macrófagos e como essa atividade difere da sinalização de IL-17. **(2 PONTOS)**

Resposta: De acordo com o texto, a proteína do SARS-CoV-2, ORF8, é capaz de induzir respostas inflamatórias em monócitos e macrófagos por meio da sinalização de um adaptador chamado MyD88, independentemente da via de sinalização do receptor de IL-17. Acredita-se que a ORF8 esteja envolvida na indução de respostas inflamatórias pulmonares e esteja associada à gravidade da doença em pacientes com COVID-19. Os pesquisadores revisaram a capacidade de IL-17 e ORF8 para induzir a expressão de genes de citocinas em monócitos e macrófagos de camundongos e humanos. Descobriu-se que a mRNA do receptor IL-17RC não foi detectada nas populações de monócitos e macrófagos de pulmões infectados com SARS-CoV-2. Por outro lado, a ORF8, mas não a IL-17, levou à expressão elevada de citocinas-alvo nas células mononucleares e macrófagos cultivados em cultura. Além disso, o sinal de ORF8 foi mantido mesmo na presença de anticorpos neutralizantes antiIL-17RA/RC e em células Il17ra2/2. O adaptador MyD88, que não é necessário para a sinalização de IL-17, foi essencial para a atividade de ORF8, revelando uma via independente envolvida na indução da resposta inflamatória pelos monócitos e macrófagos. Esses resultados fornecem novas informações sobre os mecanismos de sinalização e a patogênese da COVID-19, e podem abrir caminho para novas estratégias terapêuticas visando essa proteína acessória específica.

Com base no Artigo 2 intitulado “*Detection of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) by allele-specific PCR assay, and its distribution and effect on deltamethrin resistance in Thailand*” DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-253> responda às questões seguintes:

Questão 5. De acordo com os resultados do artigo, os mutantes para gene VGSC, apresentam resistência à deltametrina. A provável causa da resistência está associada à: **(0,5 PONTOS)**

- a) produção insuficiente de mRNA do alelo 1016G do gene VGSC nos heterozigotos.
- b) produção de mRNA do alelo selvagem nos heterozigotos mantendo canal de íons aberto.
- c) alta eficiência de ligação do inseticida à proteína do alelo mutante bloqueando o canal de íons no genótipo GG.
- d) modificação da estrutura da proteína que altera o fluxo de íons. X**

Questão 6. Stenhouse et al., 2013 desenvolveram uma metodologia para acessar o genótipo de fêmeas de *Aedes aegypti* para o gene VGSC e assim poderem fazer inferências sobre a base genética da resistência e propor formas de monitoramento da população do mosquito. Eles descrevem que várias mutações no gene VGSC contribuem com o fenótipo de resistência em *A. aegypti* e focam em duas mutações principais: V1016G e F1534C. Nenhuma dessas mutações ou sua combinação é capaz de explicar 100% da característica de resistência como pode ser visto na Figura 3. Proponha quais são os outros mecanismos que podem estar atuando na característica e que explique a sua base genética e bioquímica. **(2 PONTOS)**

Resposta: Como mostrado na Figura 3, o genótipo GG apresentava uma frequência do fenótipo resistente de 77,2% enquanto que o genótipo FF apresentava 13,1%. Isto mostra que a característica não é determinada por um único gene e que mais genes estão atuando na característica de resistência à deltametrina. Outras mutações dentro do gene VGSC poderiam estar contribuindo também com o fenótipo de resistência. Além disso, outros mecanismos de resistência poderiam estar atuando na resistência metabólica ou enzimática que consiste na rápida metabolização e detoxificação do inseticida.

Questão 7. - Segundo o artigo “uma mutação na posição 1016 no domínio II, segmento 6 do gene VGSC em *A. aegypti* leva a uma substituição de valina por glicina (V1016G) que confere resistência à deltametrina.” Assim pode-se dizer que: **(0,5 PONTOS)**

- a) Trata-se de uma substituição não sinônima onde a mudança no nucleotídeo não altera a sequência de aminoácidos de uma proteína e, conseqüentemente, seu fenótipo;
- b) Trata-se de uma substituição não sinônima onde a mudança no nucleotídeo altera a sequência de aminoácidos de uma proteína e, conseqüentemente altera o comportamento biológico do organismo avaliado;**

c) Trata-se de uma substituição não sinônima onde a mudança no nucleotídeo altera a sequência de aminoácidos de uma proteína e, podendo ou não alterar seu fenótipo;

d) Trata-se de uma substituição sinônima onde a mudança no nucleotídeo não altera a sequência de aminoácidos de uma proteína e, bem como seu fenótipo.

Questão 8. No artigo intitulado “*Detection of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) by allele-specific PCR assay, and its distribution and effect on deltamethrin resistance in Thailand*”, os autores mencionam dois tipos de mecanismos de resistência. Um desses mecanismos é descrito como resistência do tipo kdr (*knockdown resistance*). Com base nesse artigo e nos seus conhecimentos sobre esse assunto, explique: **(0,5 PONTOS)**

a) Como acontece a resistência do tipo kdr em *Aedes aegypti* resistentes a inseticidas?

Resposta: A resistência kdr é devido a uma mutação de ponto dentro do domínio de ligação do inseticida no gene que codifica proteína-alvo do inseticida.

b) O que é uma mutação de ponto?

Resposta: É a alteração em um único nucleotídeo da cadeia de DNA. Esse tipo de mutação é devido a erros na replicação do DNA.