

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROCESSOS SELETIVOS PARA MESTRADO E DOUTORADO 1-2024

Prova de Escrita de Conhecimentos - Valor 100,00

Com base no Artigo 1 “*Microbiota-driven interleukin-17 production provides immune protection Against invasive candidiasis*” DOI: 10.1186/s13054-020-02977-5 responda às questões seguintes:

QUESTÃO 1 (5 pontos). O gene de RNA ribossômico (rRNA) de subunidade pequena é um dos marcadores filogenéticos mais amplamente utilizados. A semelhança entre duas sequências de DNA é uma medida importante em muitas áreas da genética. Neste contexto, os seguintes termos “subunidade pequena” e “regiões conservadas”, significam respectivamente?

- a) a subunidade pequena é descrita como 30S (que contém a subunidade 16S rRNA), enquanto regiões conservadas referem-se a sequências de nucleotídeos que são altamente semelhantes ou idênticas.
- b) A subunidade pequena é descrita como 50S (que contém a subunidade 18S rRNA), enquanto regiões conservadas referem-se a sequências de nucleotídeos que diferem amplamente entre as espécies.
- c) A subunidade pequena é descrita como 40S (que contém a subunidade 12S rRNA), enquanto regiões conservadas referem-se a sequências de nucleotídeos que possuem importância funcional.
- d) A subunidade pequena é descrita como 20S (que contém a subunidade 8S rRNA), enquanto regiões conservadas referem-se a sequências de nucleotídeos que mudam constantemente ao longo do tempo evolutivo.

QUESTÃO 2 (15 pontos). O corpo humano abriga comunidades complexas de micro-organismos em vários locais, conhecidas como microbioma humano. Essas comunidades podem estar presentes tanto em estados de saúde como em estados de doença. No entanto, há um desafio na caracterização de

amostras polimicrobianas altamente diversas. Considerando essa situação, responda às seguintes questões:

- a) Por que técnicas clínicas convencionais são limitadas em sua capacidade de detectar e identificar a diversidade do microbioma (5 pontos) ?

Gabarito:

A identificação baseada em cultura *in vitro* depende da capacidade dos organismos de crescer e se replicar em um ambiente controlado de laboratório. Isso limita a detecção de organismos fastidiosos (requisitos nutricionais específico/exigentes) ou que requerem condições muito específicas para crescer (temperatura, nutrientes, gases), ou aqueles que têm um crescimento lento, ou ainda os que não crescem em meio de cultura. Ainda, certos organismos podem se tornar inviáveis *in vitro* devido a processamento, como a fixação em formalina e inclusão em parafina, ou durante o armazenamento, quando anaeróbios são expostos a oxigênio.

- b) Como as técnicas moleculares podem auxiliar na identificação de microbiomas (5 pontos)?

Gabarito:

Os métodos moleculares, como o sequenciamento do gene 16S rRNA, permite a identificação de microrganismos que são viáveis e não cultiváveis ou fastidiosos, que poderiam não ser detectados por técnicas convencionais baseadas em cultura. Além disso, as técnicas moleculares podem ser aplicadas diretamente em amostras clínicas, sem a necessidade de processamento adicional (técnicas de fixação e coloração, por ex.). Isso elimina a perda potencial de organismos sensíveis a essas condições.

Adicionalmente, as técnicas moleculares podem auxiliar na identificação dos gêneros, famílias e espécies das amostras.

- c) Há alguma limitação na aplicação do sequenciamento do gene 16S ácido ribonucleico ribossomal (16S rRNA) (5 pontos)?

Gabarito:

Em amostras com múltiplos microorganismos, apenas o microorganismo predominante pode ser identificado. Isso pode ocorrer porque essas técnicas detectam e amplificam sequências genéticas específicas presentes nas amostras. Se houver uma mistura de diferentes organismos, a sequência predominante será amplificada e os outros organismos podem não ser identificados.

Além disso, em algumas situações, como amostras com escassa quantidade de DNA ou presença de inibidores de reação, ruídos podem ser gerados. Isso pode limitar a capacidade das técnicas moleculares em obter resultados confiáveis em certos casos.

Uma outra limitação é que o rDNA16S possui aproximadamente 1500 pb e a informação contida nesse fragmento do DNA pode não ser suficiente para diferenciar alguns microorganismos, especialmente quando se trata de espécies.

Ainda, o estudo de microbiomas por sequenciamento, possibilita o acesso à informação genética daquela população, mas não permite o isolamento de bactérias e a obtenção de isolados, visto que para isso, é necessário utilizar estratégias de culturômica.

QUESTÃO 3. (10 pontos) Li et al., 2020 tinham como um dos seus objetivos o estudo do papel protetivo da microbiota intestinal na limitação de imunopatologias e no aumento da habilidade de sobrevivência contra infecção por *Candida albicans*. A Figura 7 apresenta uma análise da abundância das sequências da região V3/ V4 de 16S RNA das espécies/ gêneros bacterianos (*heat map*) encontrados em amostras de fezes de camundongos não-infectados ABX e CNV. Com base nos resultados apresentados na Fig. 7, os autores alcançaram esse objetivo? Houve mudanças significativas na microbiota intestinal entre os dois grupos experimentais?

Gabarito:

A Figura 7 apresenta os resultados da análise de diversidade dos dois grupos não infectados com *C. albicans*. O grupo ABX foi tratado com antibiótico e teve a sua microbiota restituída por transplante fecal enquanto o grupo CNV apresentava a microbiota convencional. Essa comparação era importante para

demonstrar que as microbiotas dos dois grupos não eram significativamente diferentes.

Os dois grupos apresentaram como filos dominantes os Bacteroidetes (44,76% - ABX e 52,47% - CNV), Proteobacteria (44,76% - ABX e 7,10% - CNV), e Firmicutes (10,48% - ABX e 33,77% - CNV). Entretanto, houve uma mudança significativa na estrutura da microbiota entre os dois grupos e uma discrepância significativa das bactérias que podem ter um papel chave durante a candidíase invasiva, como *Parasutterella* (aumentada no grupo ABX) e *Lachnospiraceae* (aumentada no grupo CNV).

Houve também uma discrepância significativa entre no ranking de abundância dos gêneros entre os dois grupos. Portanto, os resultados apresentados na Fig. 7 não foram determinantes para demonstrar o papel protetivo da microbiota intestinal de modo isolado sendo necessários mais estudos para explorar o papel específico de bactérias específicas que atuam durante o processo invasivo.

QUESTÃO 4. (15 pontos) Com base na Figura 3 responda:

- a) Baseado nas alterações do perfil de citocinas, o que pode ser inferido sobre o estado inflamatório dos dois grupos de camundongos avaliados (0,5 ponto)?

Gabarito:

Com base nos gráficos é possível inferir que os animais que receberam o tratamento de antibióticos apresentaram níveis de citocinas inflamatórias, relacionadas a imunidade inata, em nível superior aos animais com microbiota não alterada. Ou seja, foi observado um perfil mais inflamatório nos camundongos ABX infectados onde é esperado uma maior intensidade do infiltrado inflamatório associadas com possíveis consequências deletérias devido ao aumento de IL-10 (maior susceptibilidade à *Candida albicans*). As demais citocinas avaliadas apresentaram maiores níveis nos animais com microbiota e infectados. Mas, apesar de serem relacionadas a um perfil inflamatório, elas aparecem mais tardiamente na cinética inflamatória e estão

mais relacionadas à proteção contra *Candida albicans* do que com a manutenção ou desencadeamento do processo inflamatório tecidual.

- b) Qual a importância, neste contexto, de se avaliar macrófagos e neutrófilos (0,5 ponto)?

Gabarito:

Macrófagos e neutrófilos são as principais células da imunidade inata e que iniciam o processo inflamatório. Como um dos objetivos do trabalho era avaliar o impacto da microbiota na resposta imune, torna-se importante avaliar não apenas as citocinas, mas também, o infiltrado inflamatório uma vez que ele é que desencadeia o processo e poderia justificar as possíveis alterações observadas nos níveis séricos de citocinas.

- c) Qual seria a principal conclusão dos dados da figura (0,5 ponto)?

Gabarito:

A conclusão é que os animais ABX apresentaram maior intensidade da resposta inflamatória quando comparados aos animais convencionais, respaldando a hipótese de que a microbiota exerceria um papel modulador na resposta imune na candidíase, diminuindo o efeito deletério da inflamação e aumentando a resistência.

QUESTÃO 5. (5 pontos) De acordo com o artigo e com seus conhecimentos, marque a resposta incorreta com relação a microbiota intestinal dos camundongos desafiados com *C. albicans*.

- a) Camundongos ABX apresentam uma comunidade microbiana menor do que camundongos CNV com relação aos parâmetros de riqueza e diversidade.
- b) Os filos mais representados foram, em camundongos ABX, foram: Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes e Cyanobacteria.
- c) O gênero *Lactobacillus* foi um dos mais representados em camundongos CNV não infectados.

- d) Infere-se que bactérias do gênero *Lactobacillus* reduziram a virulência de *C. albicans*.
- e) Microbiota transitória é formada por microrganismos presentes temporariamente no intestino e microbiota residente refere-se aos microrganismos que se encontram relativamente fixos no intestino.

Com base no Artigo 2 “*The lncRNA MALAT1 is upregulated in urine of type 1 diabetes mellitus patients with diabetic kidney disease*” DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2022-0291 responda às questões seguintes:

QUESTÃO 6. (10 pontos). Esquematize, na forma de fluxograma, a estratégia utilizada pelos autores para avaliar a expressão de *MALAT1* e *TUG1*.

Gabarito:

200 µL urina → extração de RNA (miRNeasy Serum/Plasma Kit) → Quantificação RNA (NanoDrop) → Síntese de cDNA (transcrição reversa - SuperScript VILO Master Mix IV) → Amplificação de cDNA (Fast Real-Time PCR System) → Quantificação ou análise de expressão (método 2- $\Delta\Delta Cq$, GAPDH como gene de referência ou endógeno)

QUESTÃO 7. (10 pontos). O que autores inferiram sobre a regulação positiva e silenciamento de Malat1 nas células estudadas?

Gabarito:

A regulação positiva de Malat1 é capaz de aumentar a fibrose renal em ratos diabéticos e danificar células HK-2 incubadas com HG, agindo através da via miR-2355-3p/IL6ST. Porém, o silenciamento de Malat1 suprimiu o dano aos podócitos, bem como a inflamação e o estresse oxidativo nos rins de camundongos DKD.

QUESTÃO 8. (10 pontos). Sabe-se que as modificações que podem ocorrer nos transcritos nucleares são basicamente de três tipos, sendo o capeamento, a poliadenilação e a montagem de segmentos codificadores (*splicing*). De acordo com o texto, “as reações de RT-qPCR foram realizadas em duas etapas

separadas: 1) RNAs totais foram transcritos reversamente em cDNA; e 2) amostras de cDNA foram amplificadas por qPCR.

Pergunta-se: Qual é o papel da poliadenilação nos transcritos?

Gabarito:

- Estabilidade do RNA: ajuda a proteger o RNA da degradação enzimática, prolongando assim a vida útil do RNA na célula.
- Exportação nuclear: é importante para o transporte eficiente do RNA maduro do núcleo para o citoplasma.
- Iniciação da tradução: está envolvida no reconhecimento do mRNA pela maquinaria de tradução, facilitando assim o início da síntese proteica.

QUESTÃO 9. (10 pontos). O pesquisador Kary Mullis inventou a técnica de PCR em 1983 enquanto estava viajando de carro pelas estradas da Califórnia. Por essa invenção, Mullis e Smith foram laureados com o Prêmio Nobel de Química de 1993. A técnica de PCR revolucionou a biologia e tem diversas aplicações como diagnósticos médicos, investigação forense, segurança do alimento, melhoramento genético animal e vegetal, estudos evolutivos, dentre uma série de outros. Dieter et al. (2023) utilizam a técnica de RT-qPCR, uma variação da PCR inventada por Mullis, para estudar a expressão de *MALAT1* e *TUG1* em urina de pacientes com diabetes tipo I que também apresentavam doença renal. Qual é o processo biológico que Kary Mullis se baseou para propor a técnica de PCR? Selecione a alternativa correta e justifique a sua escolha.

- a) Transcrição
- b) Tradução
- c) Replicação - A PCR se baseia no processo de replicação onde a partir de uma fita molde é gerada uma nova fita complementar. Na reação são utilizados os componentes básicos com a enzima DNA polimerase, oligonucleotídeos iniciadores (primers) e nucleotídeos.
- d) Mutação
- e) Recombinação

QUESTÃO 10. (10 pontos) A Diabetes mellitus tipo 1 é uma doença autoimune caracterizada pela hiperglicemia devido à depleção imunomediada das células beta-pancreáticas e, conseqüentemente, da insulina. Nesta síndrome é comum a presença de reações inflamatórias em diferentes órgãos e tecidos, tais como vasculite, uveíte, glomerulonefrite, entre outras. Com base neste artigo, qual seria o papel do *MALAT1* no estabelecimento da doença renal?

Gabarito:

Segundo dados da literatura descritos neste artigo, o *MALAT 1* pode desencadear inflamação e estresse oxidativo, que são processos-chave envolvidos no desenvolvimento da doença renal, por regular positivamente uma série de moléculas inflamatórias, possivelmente através da modulação positiva da glicólise/gliconeogênese e das vias de sinalização PI3K-Akt, AMPK, Wnt e do TGF-beta. Além disso, *MALAT1* está envolvido em alterações nos podócitos e na fibrose renal.