

Prova de Seleção para Mestrado 2016 – PPGBB/ICC-Fiocruz PR

Fundamentos

Com base nos seus conhecimentos, responda as questões 1 a 7:

Questão 1.

Liste os pontos de checagem do ciclo celular e discuta a importância de cada um.

O ciclo celular, período entre duas divisões mitóticas, consiste em uma sequência ordenada de fases extremamente reguladas: G1 (Gap1), S (Síntese), G2 (Gap2) e M (Mitose). A execução precedida dos eventos de checagem é importantíssima para o sucesso da etapa seguinte e a obtenção final de células-filhas normais. Ao longo do ciclo há três pontos principais de controle que garantem a produção de células filhas geneticamente idênticas localizados em G1, G2, M. O progresso de uma célula durante cada uma das diversas etapas de divisão é regulada por sinais tanto extracelulares quanto intracelulares. A grande maioria das moléculas responsáveis por estas etapas são as ciclinas onde durante o curso do ciclo celular possuem um período de síntese crescente seguido por outro de rápida degradação, e as cinases que quando ativadas por ciclinas fosforilam as moléculas necessárias para a divisão celular.

Interfase: Durante este período, a célula está constantemente sintetizando RNA, produzindo proteínas e crescendo. A interfase pode ser dividida em três etapas principais: Gap 1 (**G1**), Síntese (**S**) onde ocorre a duplicação do DNA cromossômico, Gap 2 (**G2**), e **G0** onde células totalmente diferenciadas saem do ciclo celular e entram em estado de quiescência.

G1: (Gap1): Um importante mecanismo de controle do ciclo celular é ativado durante esta fase, em sua etapa final, para certificar que tudo está pronto para a síntese de DNA. Este *checkpoint* altamente regulado é conhecido como ponto de controle G1 ou de partida, é onde este verifica quanto à existência de nutrientes, estando o ambiente favorável, assim como se o tamanho da célula está adequado.

A passagem de G1 para **S** é determinada, entre outros eventos, pela ação da ciclina D e das CDKs 4 e 2. Na fase G1 a ligação entre a ciclina D e CDK4 ou CDK2 irá fosforilar a proteína do Retinoblastoma (pRB). Este evento provocará a liberação do E2F, fator de transcrição de genes essenciais à síntese de DNA desencadeando a replicação do DNA e progressão para a fase S.

A ação das CDKs é regulada negativamente pelas CKIs, proteínas que impedem a formação do complexo ativo ciclina / CDK. Tal complexo inibe a fosforilação do pRB levando a parada do ciclo entre G1 e S. Entre as CKIs encontra-se a proteína p16, cuja ação é se ligar CDK4 e impedir sua associação com a ciclina D. O gene CDKN2A, codificante desta proteína possui um transcrito alternativo denominado p14, produzido por processamento diferencial do mRNA.

Um exemplo da **importância** dos pontos de checagem do ciclo celular é dado a seguir: A proteína p53 atua no ciclo celular nos pontos de controle G1 / S e G2 / M levando a uma parada nestes pontos e permitindo o reparo de danos no DNA. Desta forma é evitada a replicação de DNA contendo alterações genéticas. A parada no ciclo celular em G1 após a ativação da p53 envolve a transcrição do gene codificante da proteína p21 / WAF inibidora de cinases dependentes de ciclinas (CDKs). O efeito imediato da indução da p21 é a inibição da atividade da proteína do retinoblastoma. (pRB). A pRB na fase G1 encontra-se hipofosforilada e ligada a fatores de transcrição

da família E2F; quando a pRB é fosforilada por cinases dependente de ciclinas, tais fatores são liberados, resultando na transcrição de genes da **fase S** do ciclo celular. Esta via, a p21 inibe o complexo de CDKs, resultando no acúmulo de pRB hipofosforilada, complexada a E2F parando o ciclo celular em G1. Esta parada é de fundamental **importância** para permitir o reparo do DNA danificado antes que ocorra sua duplicação na **fase S**. Mutações na p53 podem levar a carcinogênese.

G2: (Gap 2): Consiste no momento em que a célula se prepara para a divisão. No ponto de controle G2, erros eventuais de replicação do material genético são reparados. O término do G2 representa um outro ponto de checagem para determinar se a célula pode proceder para a Mitose e se dividir. Este ponto de checagem verifica se o DNA foi replicado e não se encontra danificado (no caso de radiação), antes de repassar o conteúdo genético para as células filhas. Caso seja necessário realizar reparos no DNA ou a replicação não foi completa, a célula não poderá proceder para a fase M, sendo assim de extrema **importância**. Também é realizada uma checagem para verificar se o ambiente é favorável, só assim prosseguirá para a fase M.

Mitose: Crescimento celular e produção de proteínas é encerrado e a energia da célula é utilizada para a divisão celular. No ponto de controle M o alinhamento dos cromossomos metafásicos é devidamente processado. Caso todos os cromossomos não estiverem ligados ao fuso mitótico, as células filhas não serão idênticas

Questão 2.

Descreva as principais etapas de iniciação, alongamento e término do processo de tradução em eucariotos.

Conforme solicitado, aqui descrevemos as etapas em células eucarióticas lembrando que, nestas células, diferentemente das procariontes: **(1)** As subunidades ribossômicas são maiores (40S e 60S). **(2)** O aminoácido iniciador da síntese proteica é também metionina; porém aqui, não é formilado. **(3)** O RNA mensageiro de eucarioto contém poli A na sua extremidade 3' e o CAP na sua extremidade 5' que reconhece características importantes para a ligação ao ribossoma. **(4)** A iniciação utiliza um maior número de fatores de iniciação (eIFs); até hoje identificados acima de 10. **(5)** Diferentemente de procariotos, eucariotos parecem possuir apenas um fator de terminação no reconhecimento de todos os códons de finalização.

Iniciação: Um processo complexo onde as subunidades ribossômicas de 40S e 60S juntam-se com o RNAm e o metionil-trna iniciador (Met-tRNA_i) para formar o complexo de iniciação 80S competente na tradução do RNAm. Para que a iniciação se processe, é necessário que o ribossoma seja dissociado, com a cooperação dos fatores eIF3 e eIF6 em suas subunidades de 40S e 60S. Ocorre então a checagem do RNAm onde a estrutura do CAP na extremidade 5' liga-se a vários eIFs. O preparo do RNAm é executado em quase toda a totalidade pelo eIF-4F para promover modificações estruturais que permitirão sua ligação ao complexo de iniciação mediadas pelo eIF-4G. Após o alinhamento correto do RNAm no complexo de pre-iniciação e o Met-tRNA_i estar ligado ao códon de iniciação AUG é feita a associação da subunidade ribossômica de 60S. Este evento é catalizado por eIF-5 que já havia se ligado anteriormente ao complexo de pre-iniciação e a energia é disponibilizada pela hidrólise do GTP ligado a eIF-2; esta formada assim, o complexo de iniciação de 80S. O complexo GTP-eIF-2 originado, se liga a eIF-2B que permitirá a troca de um novo GTP pelo GDP ligado ao eIF-2. quando o novo GTP é trocado pelo GDP eIF-2B se dissocia do eIF-2. Este ciclo de regeneração do eIF-2 é chamado "ciclo do eIF-2".

Finalmente, o Met-tRNA_i estará ligado ao mRNA no sítio-P (sítio peptídico do ribossoma de 80S). O outro sítio do ribossoma chamado sítio-A (sítio aceptor ou sítio do aminoácido) está disponível para a ligação do segundo tRNA carregado, evento que caracterizará início da segunda etapa da biosíntese de proteína, o alongamento.

Alongamento: Esta etapa, requer a presença dos fatores de alongamento (eEFs). O processo é cíclico de maneira que ao final da adição de cada aminoácido à cadeia peptídica nascente, o sítio-A estará novamente livre para receber o novo aminoacil-RNAt especificado pelo próximo códon do RNAm. A etapa de alongamento pode ser dividida em:

A) Ativação do aminoácido, encaixe do aminoacil-RNAt ao ribossoma, reação de transpeptidização e translocação. Conforme descrito acima, o aminoácido iniciador é recebido no sítio-P do ribossomo. Isto significa que o aminoacil-RNAt subsequente entrará diretamente no sítio A e após sua incorporação ao peptídeo nascente, o ribossomo deverá se mover sobre o RNAm até o próximo códon. Cada aminoácido que chega é trazido ao ribossomo sobre a forma de um complexo ternário. Quando tRNA carregado correto é depositado no sítio A, GTP é hidrolizado e o complexo eF-1α-GDP se dissocia. Para que a molécula de eF-1α possa participar ser reutilizada, o GDP ligado ao fator precisa ser trocado por GTP. Esta operação é catalizada por um outro fator de alongamento, eEF-βδ, permitindo o eF-1α a funcionar cataliticamente.

O peptídeo crescente ligado ao RNAt no sítio P-ribossomal é transferido ao agrupamento amínico do aminoacil-RNAt que se encontra no sítio A-ribossomal. A reação é catalizada pela peptidil transferase e o processo chamado transpeptidização: é a formação da ligação peptídica. A proteína nascente encontra-se agora ligado ao RNAt no sítio A. A liberação deste sítio é condição imperativa para o recebimento de outro aminoacil-RNAt. Isto se passa durante a etapa chamada translocação. A translocação depende da hidrólise de GTP e é catalisada por outro fator de alongamento, o eEF-2. Durante esta etapa, o RNAt abandonará o sítio A e o ribossoma se moverá sobre o RNAm até que novo códon fique posicionado no sítio A, agora novamente vazio. O alongamento da cadeia consiste na repetição cíclica destas etapas.

Terminação: O término da síntese protéica utiliza os fatores de terminação ou de liberação (eRFs). Enquanto procariotos possuem RFs diferentes, células procarióticas possuem apenas um tipo, eRF-I com variantes pertencentes a uma mesma família de proteína. O fator de eucarioto reconhece todos os codons de terminação encontrados no RNAm destas células (UAA, UAG, UGA). Quando os ribossomos alcançam um destes códons, RF se liga ao sítio A ribossomal juntamente com GTP. A ligação estimulará a peptidil-transferase transferir o agrupamento peptidil para água ao invés de o transferir para um aminoacil RNAt. O RNAt não carregado que foi deixado no sítio-P é expelido com hidrólise concomitante de GTP. O ribossoma inativo de 80S é liberado do RNAm e passa a integrar um estoque de ribossomas 80S disponível para sofrer o mesmo ciclo de eventos descritos até aqui. Uma nova rodada de tradução da mensagem será iniciada.

Questão 3.

Um pesquisador havaiano está interessado em caracterizar a enzima fosfatase ácida do protozoário *Jarrelia atramenti*, um parasita encontrado no muco do tubo respiratório de *Kogia brevicepis*, um cachalote pigmeu pouco conhecido. Após diversas tentativas o pesquisador conseguiu estabelecer uma cultura do protozoário em meio de cultura axênico. E em contato com um pesquisador amigo ele conseguiu uma alíquota de um anticorpo policlonal contra fosfatase ácida. Uma hipótese que ele pretende testar é se esta enzima lisossomal é também secretada pelo protozoário, sendo então responsável pela patogenicidade do parasita. Assim, ele pretende verificar se este protozoário possui ao menos duas isoformas da enzima, uma lisossomal e outra secretada. No caso da enzima lisossomal, para poder separar esta proteína específica das milhares outras que compõem a célula ele pensou em um protocolo de purificação de 3 etapas, constando de a) lise celular, b) fracionamento celular para obtenção

de uma fração purificada de lisosomos, livre de peroxisomos e c) separação e identificação da enzima a partir da fração lisosomal.

Que processos (ao menos 2 de cada) de cada etapa podem ser utilizados neste protocolo?

a. Lise celular

Choque osmótico, ultrassom, passagem forçada por orifício estriado, maceração, cavitação.

b. Fracionamento celular

Centrifugação por diferentes velocidades, centrifugação em gradiente de densidade (contínuo ou descontínuo) (por velocidade, por equilíbrio). Testar presença de peroxisomos contaminantes dosando a atividade de catalase.

c. Separação e identificação da enzima

c.1. Identificação da enzima a partir da fração lisosomal: Após lise dos lisosomos (por exemplo: uso de detergentes, ultra-som): A) separar as proteínas por: (a) cromatografia em coluna (filtração em gel, de afinidade caso ele tenha anticorpo anti Pase ácida) e dosar a atividade de fosfatase ácida em cada fração coletada; OU B) eletroforese em gel de poliacrilamida detectar banda positiva com reação para fosfatase ácida; OU C) caso obtenha um protozoário transfectante expressando fosfatase ácida marcada com tag GST, purificar por coluna de afinidade contendo glutatona.

c.2. Identificação da proteína: western blot e/ou imunolocalização com anticorpo específico (fluorescência ou ME)

Questão 4.

Uma proteína foi endocitada por um macrófago, após ser reconhecida e ligada a um receptor específico existente na superfície do macrófago.

a. Como ocorre a formação de uma vesícula endocítica na endocitose mediada por receptor, com participação da clatrina?

Após o receptor se ligar ao seu ligante ele sofre uma modificação em sua porção citoplasmática, a qual se liga a proteínas do complexo adaptador AP2 (possui 4 subunidades). A clatrina se liga ao AP2 e ao se polimerizar (cadeias leves e pesadas de clatrina) ela promove o arredondamento da membrana plasmática, formando também um revestimento proteico. A vesícula é destacada da membrana plasmática por ação da proteína dinamina.

b. Quais os compartimentos da via endocítica que esta proteína deve percorrer até chegar ao lisossomo? Caracterize os compartimentos dando ao menos duas de suas características.

- Endossomo inicial: pH 6,5, tem receptor de superfície, tem RAB4/RAB5, próximo à superfície.
- Endossomo de reciclagem: tem receptor de superfície, pH 6,5, sem material ingerido
- Endossomo tardio: pH 6, sem receptor de superfície, com enzimas lisossomais inativas, tem RAB7/RAB9, próximo ao núcleo.
- Lisossomo: pH 5, sem receptor de superfície, com receptor de manose 6-fosfato, com lamp e lgp120, com enzimas lisossomais ativas.

- c. Se as enzimas lisosomais começam a ser sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, como elas são direcionadas aos lisossomos?

Enzimas lisosomais são glicoproteínas, glicosiladas no RER. No Golgi ocorre a adição de fosfato a uma manose, formando manose-6-fosfato. Um receptor de M6P na rede Trans do Golgi direciona a enzima lisosomal ao endossomo tardio, via vesícula revestida com clatrina.

Questão 5.

Um pesquisador tem uma sequência de DNA que codifica uma proteína viral residente no citoplasma, mas ele deseja que esta proteína seja expressa no lúmen do retículo endoplasmático rugoso (RER).

- a. Usando engenharia genética, o que ele pode fazer para que sua proteína seja direcionada ao RER?

Uma proteína que deve ser glicosilada é enviada ao retículo endoplasmático rugoso (RER) por meio de uma sequência sinal formada em geral por aminoácidos apolares. Assim, por engenharia genética o pesquisador deve criar proteína de fusão na qual uma sequência sinal é ligada à proteína que normalmente reside no citoplasma.

- b. Como ele pode verificar se o endereçamento foi correto?

Após o cDNA ser transfectado em células a localização da proteína de fusão é determinada por imunofluorescência ou imunolocalização por microscopia eletrônica, em experimentos de colocalização com alguma proteína marcadora de RE (por exemplo, BiP).

Questão 6.

A cada dia o DNA no interior das células de organismos vivos é repetidamente danificado pela exposição à radiação e agentes químicos do ambiente, bem como por moléculas reativas geradas pela própria célula. Além disso, danos também podem surgir a cada ciclo celular, durante o processo de duplicação do DNA. Todos esses fatos tornam a molécula de DNA inerentemente instável. A razão pela qual as informações genéticas, armazenadas sob a forma química de DNA, são mantidas frente a este completo caos químico deve-se a uma série de sistemas moleculares que monitoram e reparam continuamente o DNA. Um desses mecanismos de controle é dado pela atividade *proofreading* da DNA polimerase, pois permite que a enzima verifique e corrija o pareamento de cada nucleotídeo durante a síntese de DNA.

- a. Poderia a necessidade de acurácia na replicação do DNA explicar porque o processo de replicação ocorre apenas na direção 5'-3'? Fundamente a sua resposta com base na atividade exonuclease da DNA polimerase.

Sim, a necessidade de alta precisão provavelmente explica porque a síntese da molécula de DNA ocorre apenas na direção 5'-3', uma vez que erros decorrentes da polimerização não poderiam ser simplesmente hidrolisáveis, pois a extremidade 5' assim formada terminaria a síntese de DNA por não ter energia livre para promover a ligação fosfodiéster. Por sua vez, o crescimento na direção 5'-3' da cadeia de DNA permite que esta continue a ser estendida quando um erro de polimerização é removido por correção exonucleotídica (pg 271 do Molecular Biology of the Cell).

Informações adicionais: A DNA polimerase, utilizando a fita molde 3'-5', faz a ligação de um nucleotídeo na cadeia crescente de DNA a partir da extremidade 3'-OH livre do último nucleotídeo adicionado. O grupamento 3'-OH livre da cadeia de DNA em formação faz um ataque nucleofílico sobre o fosfato alfa do dNTP que está sendo incorporado, fornecendo energia para a polimerização. O sítio catalítico de exonuclease da DNA polimerase desfaz a ligação fosfodiéster e o nucleotídeo mal pareado é desligado da cadeia de DNA em formação, possibilitando a incorporação de um novo trifosfato de desoxirribonucleotídeo.

- b. Recentemente três cientistas pioneiros, Lindahl, Modrich e Sancar, foram laureados com o prêmio Nobel de química por mapear como os sistemas de reparo funcionam em nível molecular. Discorra sobre os dois principais mecanismos de reparo do DNA.

Reparo por excisão de nucleotídeos: nesta via um complexo multienzimático é capaz de detectar uma alteração volumosa na estrutura da dupla hélice de DNA (reação covalente de base com grandes hidrocarbonetos ou dímeros de pirimidinas) e clivar a ligação fosfodiéster na fita anormal, nos dois lados da distorção. Em seguida a DNA helicase remove o oligonucleotídeo de fita simples contendo a lesão. O intervalo produzido na hélice é então corrigido pela DNA polimerase e DNA ligase.

Reparo por excisão de base: esta via repara a base danificada de um nucleotídeo, envolvendo diversas enzimas no processo. A DNA glicosilase detecta o defeito de base e catalisa a sua remoção hidrolítica. A ausência da base é reconhecida pelas enzimas endonuclease AP e pela fosfodiesterase que reconhecem a alteração e removem o açúcar-fosfato. Em seguida a DNA polimerase adiciona um novo nucleotídeo que é ligado pela DNA ligase. (pg 271 do *Molecular Biology of the Cell*).

Questão 7.

Em todas as células do organismo, proteínas essenciais para a manutenção da vida, normalmente envolvidas em processos básicos como geração de energia, replicação e manutenção do material genético são expressas de forma constitutiva, são os chamados genes housekeeping. Por outro lado, a expressão de determinados genes ocorre apenas em algumas células de determinados tecidos, cuja função está diretamente relacionada ao tecido/órgão.

Descreva um mecanismo de controle da expressão gênica de células eucariotas em nível:

- a. Transcricional

Em nível transcricional a célula pode regular a expressão das proteínas que sintetiza:

- controlando como e quando um gene é transcrito (controle transcricional): A iniciação da transcrição é o ponto mais crítico do controle da expressão gênica, por isso os genes eucarióticos possuem muitas regiões regulatórias a montante da ORF. O acesso às regiões promotoras é restrito pela estrutura da cromatina (heterocromatina – estrutura supercondensada do DNA; eucromatina – região pouco condensada). O remodelamento da cromatina constitui um mecanismo de controle da transcrição. Esse remodelamento ocorre pela acetilação ou movimentação dos nucleossomos. A acetilação das histonas diminui a compactação da cromatina, pois diminui a interação do complexo do “core” com o DNA, fazendo com que os sítios promotores e reguladores fiquem mais acessíveis para a ligação dos fatores de transcrição.

b. Pós-transcricional

Em nível pós-transcricional a célula pode regular a expressão gênica:

- controlando como o transcrito de RNA é processado e transportado do núcleo para o sítio de tradução (controle de processamento e transporte de RNA): este processo de controle ocorre no núcleo das células eucarióticas e determina como o transcrito inicial primário será convertido a um mRNA funcional. Três principais eventos ocorrem: capeamento da região 5' do RNA; clivagem e poliadenilação da região 3' do RNA e splicing do RNA (retirada de íntrons). Esses eventos determinam quais mRNA deverão ser exportados para o citoplasma. Além disso, o splicing alternativo pode determinar a expressão de diferentes domínios funcionais em proteínas.

- Controlando a localização e degradação do mRNA: No citoplasma, os mRNAs provenientes do núcleo são encontrado pelos ribossomos e passam primeiramente pelo teste de degradação mediado por ausência de sentido. A presença de sinais específicos no próprio mRNA possibilita o correto posicionamento dos mRNAs próximo dos sítios onde as proteínas codificadas são necessárias ou em locais que permitam o seu correto endereçamento.

A taxa de degradação de cada mRNA também é controlada e regula a concentração de mRNA e, conseqüentemente, a quantidade de proteína traduzida. A degradação do mRNA pode ocorrer pelo mecanismo de degradação de mRNA dependente de desaminação ou ser regulada por outros mecanismos, tal como o miRNA. Quando expressos esses RNAs de aproximadamente 22 nucleotídeos inibem a tradução do mRNA, ao qual eles hibridizam.

- selecionando quais mRNA são traduzidos pelos ribossomos (controle traducional):

O processo de tradução de um polipeptídeo a partir de um mRNA tem início no códon de iniciação da tradução (AUG), localizado na região próxima à extremidade 5'cap. A eficácia da tradução do mRNA é influenciada pela acessibilidade ao códon AUG ao ribossomo. A fosforilação da proteína EIF-2 ao traduzir-se na repressão do início da tradução constitui uma das formas de regulação da iniciação da tradução. Outros fatores como a disponibilidade de ribossomos e de tRNA, estabilidade do mRNA e velocidade da síntese de cada molécula polipeptídica pode controlar a expressão gênica a nível traducional.

-ativando, inativando, degradando ou compartimentalizando seletivamente moléculas de proteínas específicas após a sua produção (controle da atividade proteica):

Dentre os mecanismos regulados de degradação de proteínas, uma importante via de degradação é mediada por proteassomo. Nesse mecanismo, as proteínas a serem degradadas são marcadas através da ligação covalente da ubiquitina, realizada por enzimas específicas. Em seguida, os complexos ubiquitina/proteína são submetidos à degradação pelo proteassomo, uma estrutura composta por diversas enzimas que possuem função proteolítica. (capítulo 7 do Molecular Biology of the Cell).

Prova de Seleção para Mestrado 2016 – PPGBB/ICC-Fiocruz PR

Interpretação de Artigos Científicos

Selecione e responda quaisquer 3 perguntas, com base nos respectivos artigos:

Obs.: Para cada resposta, indicar claramente o número do artigo e número da questão.

ARTIGO 1

Physiological ER Stress Mediates the Differentiation of Fibroblasts

Matsuzaki *et al.* (2015) PLoS ONE 10(4): e0123578

Questão 1.

Os autores induziram stress no reticulo endoplasmático de fibroblastos utilizando tunicamicina a 1 µg/ml. Qual o racional do tratamento com este inibidor, a esta concentração?

Tunicamicina é um inibidor da glicosilação do tipo N, que ocorre no lúmen do RER. Assim, inibição deste tipo de glicosilação leva a um acúmulo de proteínas no lúmen do reticulo, levando a um stress da organela. Este mesmo stress ocorre quando uma célula se diferencia naturalmente em miofibroblasto. Portanto, uso de tunicamicina mimetiza a indução de stress de diferenciação celular que ocorre naturalmente. Uso de quantidade maior de tunicamicina induz um stress maior, que leva à apoptose. Portanto deve ser feito um stress suave com a droga.

Questão 2.

Como o stress - e consequente diferenciação - de fibroblastos pode favorecer a cicatrização de feridas?

O stress induzido de fibroblastos favorece o aumento na síntese e liberação de diversas proteínas de matrix extracelular, como colágeno e glicosaminoglicanas. A matrix extracelular tem importante função na cicatrização de feridas. Além disto, fibroblastos sob stress em uma área de cicatrização podem se diferenciar em miofibroblastos para recuperar a área ferida.

Questão 3.

Explique a Figura 1 do artigo, definindo a diferença entre estimulação contínua e transiente. Qual conclusão dos autores?

Para determinar a condição ótima para coletar fibroblastos primários sob stress fisiológico de RE foram examinados diversos métodos de cultura (Fig. 1).

Estimulação contínua com tunicamicina (isto é, droga presente o tempo todo na cultura) a 1 µg/ml induziu altos níveis de mortalidade após 24, 48, 72 e 96 horas de cultivo, em níveis maiores (nestes mesmos tempos) do que estimulação transiente (isto é, droga adicionada por um certo tempo e depois continuar incubando em meio sem droga) por 30 minutos ou 24 hs (Fig. 1A).



Foi possível notar que estimulação transiente por 24 horas causou leve mortalidade após 24 horas, enquanto estimulação transiente por 30 minutos foi a melhor condição, só causando leve mortalidade após 48 horas. Os autores decidiram então testar variações do tratamento transiente.

Os experimentos com tratamento transiente foram seguidos por 3 dias (72h, ver M&M). Tratamento apenas nas 24 horas iniciais com 2 µg/ml causou redução significativa da viabilidade celular, enquanto tratamento com 5 minutos com 2 µg/ml não causou (Fig. 1B). Mas células tratadas com a droga a 2 µg/ml por 5 min a cada 24hs (por 3 dias) tiveram viabilidade celular reduzida significativamente (Fig. 1C)

Os autores então diminuíram a dose da droga. Tratamentos com tunicamicina a 1 µg/ml por 5 minutos ou 1h a cada 24 horas por 3 dias foram testados. Tratamento por 1h causou redução significativa da viabilidade celular, mas tratamento por 5 min não causou. Assim, os autores decidiram que a condição de stress era tratamento com tunicamicina a 1 µg/ml por 5 min a cada 24 horas.

ARTIGO 2

Molecular cloning, characterization and diagnostic performance of the *Schistosoma bovis* 22.6 antigen

de la Torre-Escudero *et al.* (2012) *Veterinary Parasitology* 190: 530-540.

Questão 1.

A esquistossomose bovina constitui um importante problema de saúde animal, apresentando grande impacto econômico na produção de gado. O desenvolvimento de um teste específico para diagnóstico da esquistossomose bovina poderia auxiliar no programa de controle e manejo dos animais infectados por *Schistosoma bovis*. O artigo descreve a caracterização de um potencial antígeno recombinante para utilização em imunodiagnóstico da esquistossomose bovina.

a. Descreva as vantagens que a proteína Sb22.6 apresenta em relação ao extrato solúvel do parasita (teste *gold standard*) para o desenvolvimento do imunoensaio.

A reação cruzada é frequentemente um problema encontrado nos ensaios de imunodiagnóstico. No caso específico do diagnóstico da esquistossomose bovina, a utilização de extratos solúveis do parasita como antígeno de diagnóstico em ensaio ELISA apresenta o inconveniente que a sua produção é limitada e demorada e, adicionalmente, tem uma proporção elevada de glicoproteínas, que podem dar origem a reações cruzadas com outros helmintos.

A utilização de antígenos recombinantes em imunoensaios apresenta-se mais vantajosa que a utilização de extratos solúveis de parasitas devido as técnicas de engenharia genética possibilitar a produção de antígenos recombinantes específicos em quantidades suficientes para a realização de teste diagnóstico em maior escala, além de minimizar a variabilidade do antígeno a cada lote, melhorando a sensibilidade e especificidade do ensaio. Além disso, o antígeno Sb22.6 apresenta vantagem em relação ao extrato solúvel do parasita pelo fato de suas isoformas terem sido reconhecidas pelos anticorpos IgG a partir de soro de animais infectados com o verme, em estudos anteriores. Outra vantagem é que a proteína não se apresenta na forma glicosilada, o que reduz a possibilidade de reações cruzadas, devido à presença de anticorpos contra epítopos de carboidratos. Além da sequência da proteína Sb22.6 ter baixa similaridade com outras proteínas de helmintos.

b. Descreva o princípio do teste diagnóstico proposto no estudo.

O ensaio imunoenzimático em formato *ELISA* (do inglês Enzyme Linked Immunosorbent Assay) é um teste colorimétrico semi-quantitativo baseado nas reações antígeno-anticorpo, detectáveis através de reações enzimáticas.

O teste diagnóstico proposto no estudo foi desenvolvido em formato ELISA indireto, utilizado para detecção de anticorpos em amostras biológicas. Neste caso, o antígeno contra o qual se deseja detectar a produção de anticorpos é imobilizado em fase sólida, ou seja, aderido aos poços da microplaca. Após o bloqueio, as amostras de soro são incubadas, por períodos de tempo e temperatura padronizados; em seguida, as placas são lavadas para retirar os anticorpos não específicos e incubadas com anticorpos específicos para o primeiro anticorpo, marcados com uma enzima (fosfatase alcalina, por exemplo). A revelação da reação antígeno-anticorpo é feita pela incubação com o substrato da enzima e com os doadores de hidrogênio. A leitura da intensidade da cor é obtida em espectrofotômetros, adaptados à leitura de placas, e estes resultados são dados em Densidade Ótica (DO), a qual é proporcional à concentração de anticorpos na amostra.

- c. O trabalho apresentou resultados satisfatórios quanto aos objetivos propostos? Identifique os resultados obtidos para cada objetivo proposto.

Objetivos:

- **clonar o gene Sb22.6:** amplificação do gene por PCR a partir do RNA dos vermes *Schistosoma bovis* adultos e clonados em vetor pSC-A e subclonados em vetor pGEX-4T-1 em fase com a tag GST.
- **sequenciar o clone obtido:** A clonagem foi confirmada por sequenciamento
- **expressar e caracterizar a proteína Sb22.6 de *Schistosoma bovis*:** Expressão da proteína recombinante na sua conformação nativa em *Escherichia coli* cepa BL21. Purificação da proteína por cromatografia de afinidade à GST. Produção de anticorpos policlonais em coelhos. A reatividade dos anticorpos foi verificada por western blot e ELISA contra o antígeno Sb22.6 e o extrato solúvel do parasita. Os estudos de imunolocalização foram realizados em cortes histológicos, na forma adulta do parasita e em esquistossômulo.
- **avaliar a utilidade da proteína recombinante como antígeno para o diagnóstico em formato ELISA para a detecção de gados infectados com *S. bovis*:** A reatividade do antígeno recombinante Sb22.6 recombinante em ensaio ELISA apresentou-se satisfatória, uma vez que o antígeno foi reconhecido por anticorpos contra *S. bovis* presentes em soro de hamsters experimentalmente infectados e soro de gado proveniente de área endêmica de *S. bovis*. O ensaio utilizando o antígeno recombinante Sb22.6 exibiu um desempenho semelhante quando comparado com o diagnóstico utilizando o extrato solúvel de vermes adultos (SbC).

Questão 2.

- a. Em relação ao estudo de imunolocalização quais as conclusões obtidas.
O ensaio de imunolocalização revelou que a proteína Sb22.6 é expressa no tegumento e em alguns tecidos internos dos vermes adultos, mas que não está exposta na superfície dos vermes adultos e de esquistossômulo.
- b. Analisando a figura 2 você considera satisfatória a purificação da proteína recombinante Sb22.6 para a realização dos ensaios de imunolocalização? Comente. Quais a(s) estratégia(s) que poderia(m) ser utilizada(s) para aumentar a confiabilidade dos resultados?

Analisando a qualidade da purificação da proteína recombinante por SDS-PAGE podemos constatar a presença de uma proteína de aproximadamente 74 kDa, provavelmente contaminante. A análise por western blot do soro hiperimune produzido em coelho demonstra que o soro reage fortemente com a proteína recombinante de 22.6 kDa e reconhece o antígeno nativo de 22.6 kDa presente no extrato do tegumento do parasita. No entanto, observa-se a presença de reação inespecífica, não observada no controle negativo do soro. Dessa forma, um segundo método de purificação da proteína recombinante para a obtenção de um soro policlonal mais específico ou a produção de anticorpos monoclonais contra a proteína Sb22.6 poderiam ser métodos empregadas para aumentar a confiabilidade dos ensaios de imunolocalização.



Questão 3.

Explique porque os autores realizaram o experimento mostrado na figura 4 e quais as conclusões foram obtidas.

Referente ao ensaio apresentado na figura 4, os autores utilizaram o soro de cordeiros infectados com *Fasciola hepatica* para avaliar a especificidade do antígeno Sb22.6 quanto ao reconhecimento de anticorpos contra o *S. bovis*. A análise foi realizada com base nos estudos de filogenia, em que se identificou homologia de sequência entre Sb22.6 e os ortólogos de *Fasciola spp.* Além do fato de que a *F. hepatica* também pode infectar bovinos. Os resultados da análise dos soros de cordeiros infectados com *F. hepatica* mostraram que o antígeno Sb22.6 não apresenta reação cruzada com anticorpos contra este parasita.

ARTIGO 3

Introduction to Computational Proteomics

Coline and Bennett (2007) PLoS Comput Biol 3(7): e114.

Questão 1.

Dado que a massa do aminoácido K ~ 128.1 , do Próton ~ 1 e H₂O ~ 18 , utilize os dados da Figura 4 para obter a massa dos aminoácidos V (0.5) e S (0.5).

$$V = 228.2 - 1 - 128.1 = 99.1$$

$$S = 639.4 - 552.4 = 87.0$$

Questão 2.

- a) Seguindo o exemplo da Figura 4, calcule a *série y+* dos fragmentos teóricos para o peptídeo SPVL. (0.5)

{ 132.1, 231.2, 328.2, 415.3 }

- b) Escreva um algoritmo / código fonte para calcular a *série b+* de um peptídeo (0.5)

```
string peptide = ReadLine();
double mass = 1;
foreach (char a in peptide)
{
    double massOfAminoacid = ObtainMassOfAminoacid(a);
    mass += massOfAminoacid;
    WriteLine (mass);
}
```

Questão 3.

O artigo propõe diversas métricas que são utilizadas para comparar espectros experimentais contra teóricos gerados a partir de um banco de sequencias. Proponha uma métrica de comparação (1 pto).

Por exemplo,

Definimos um espectro de massas como $E = \{(m_1, i_1), (m_2, i_2), \dots, (m_n, i_n)\}$, onde m representa um determinado m/z e i a respectiva intensidade do pico espectral.

Definimos uma métrica $S = \langle \hat{E}_t, \hat{E}_e \rangle$, ou seja, S é resultante do produto escalar dos vetores unitários $\hat{E}_t$, proveniente do espectro teórico, e $\hat{E}_e$, do espectro experimental. Para isso, as intensidades são multiplicadas apenas quando a dois m/z 's, provenientes dos diferentes espectros, coincidem dentro de uma determinada tolerância.