



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIROLOGIA
CURSO DE MESTRADO**

SELEÇÃO PARA O MESTRADO 2020

Instruções ao candidato:

- Ler atentamente o texto e as questões.
- Responder as questões com base nas informações do texto.
- A duração da prova é de 4 (quatro) horas.
- Preencha o seu número de inscrição em todas as páginas.
- As páginas 8 e 9 poderão ser usadas para responder as questões discursivas.

Boa Sorte!

ANANINDEUA,
21 de janeiro de 2020

Instituto Evandro Chagas
Programa de Pós-Graduação em Virologia

Seleção para o mestrado

Nº de Inscrição do candidato:

Nome:

1) De acordo com o artigo *Molecular survey of viral and bacterial causes of childhood diarrhea in Khartoum State, Sudan*, a infecção por rotavírus observada nesse estudo foi prevalente entre pacientes vacinados e crianças de até dois anos de idade. Segundo os autores, o que isso pode indicar? (1,0 pt.)

- Pode indicar a circulação local de sorotipos de rotavírus que não estão incluídos na vacina Rotarix® (que consiste apenas do tipo G1P[8]);
- Pode indicar que a vacina tenha se deteriorado durante o transporte ou acondicionamento;
- Pode indicar que crianças de até 2 anos de idade não tenham completado o esquema vacinal.

2) De acordo com o artigo *Molecular survey of viral and bacterial causes of childhood diarrhea in Khartoum State, Sudan*, qual foi a coinfecção mais frequente observada no estudo? (1,0 pt.)

() rotavírus e norovírus G2

() norovírus G2 e adenovírus

(X) rotavírus e *Shigella*

() norovírus e *Giardia*

() Não foram observados casos de coinfecção ao longo do estudo.

3) No artigo **A CRISPR toolbox to study virus–host interactions** o autor descreve como a tecnologia de CRISPR está sendo utilizada para o melhor entendimento da biologia vírus-hospedeiro, além nos levar a melhor compreender o processo de replicação viral e patogênese viral (2,0 pt.).

Com base na leitura do artigo já citado acima responda as seguintes questões:

- a) Um dos grandes desafios para aplicação de métodos em CRISPR é o desenvolvimento dos alvos como os sgRNAs e a sua relação com o processo de replicação. Desta maneira explique como deve ser desenvolvido os genes alvos e qual é a relação deles para as células utilizadas em experimentos de infecção viral.

Para a criação de alvos na técnica de CRISPR é necessário levar em conta o grau de "saturação" na triagem genética; isto é, a fração de genes alvo que é possível identificar.

Para realizar este desenvolvimento é necessária a escolha da linhagem celular adequada assim como uma análise genética profunda sobre estas células. Para que uma célula seja escolhida é necessário testar se as mesmas são permissivas ou não permissivas à infecção pelo vírus, este fato é

determinado pela expressão de genes que facilitam a replicação do vírus e genes que restringem a infecção pelo vírus. As análises genéticas podem descobrir genes que promovem e restringem a replicação de vírus, dependendo da escolha do tipo de célula hospedeira (permissiva ou não permissiva) e do tipo de rastreamento (perda de função ou ganho de função).

O principal componente do RNA guia (sgRNAs) é uma sequência de RNA que guia a nuclease Cas9 a cortar em um local específico no genoma. Um bom gRNA garante que os cortes sejam mais precisos e não ocorra fora do alvo (não intencionais- *off target*), ao mesmo tempo tem que possuir a máxima eficiência no alvo.

Dentro deste panorama apresentado os sgRNAs tornam-se de grande importância, pois estes são introduzidos nas células de maneira combinada características específicas. Para garantir a representação apropriada de cada um dos sgRNAs (características específicas) no “pool” numerosas células que sofrem são sofrem seleção fenotípica. Na prática, muitas linhagens celulares transformadas serão adequadas para gerar uma biblioteca de células mutagênicas; no entanto, as células primárias têm uma capacidade proliferativa limitada e, portanto, é mais desafiador transduzir e expandir essas células de linhagem contínua. Assim podemos entender a dificuldade de manutenção e de mudança fenotípica ocorrido em cada uma dessas células.

- b) Explique como a tecnologia CRISPR pode ser utilizada na produção de antivirais e quais são os principais desafios para o desenvolvimento desta.

Existe um grande potencial para a aplicação da tecnologia CRISPR na prevenção e tratamento de doenças, direcionando vírus e seus vetores. Esta tecnologia pode ser usada para tratar infecções persistentes por vírus, como infecções por HIV, HBV, HCV. Recentemente, o DNA circular de HBV, uma das marcas registradas da infecção persistente pelo HBV, foi alvo de estudos em cultura de células e em modelos animais para evitar a infecção resistente, isto é, como um antiviral. Além disso, CRISPR podem ser usadas para entender o modo de ação dos antivirais. Por exemplo, o entendimento do mecanismo de ação do GSK983, um medicamento antiviral que pode ser eficaz no tratamento de uma gama de vírus de RNA e DNA. Verificou-se que o GSK983 bloqueia a replicação do vírus inibindo a enzima di-hidro-orotato desidrogenase da enzima de biossíntese celular, reduzindo assim os níveis intracelulares desta enzima que são necessárias para a síntese viral de ácidos nucleicos durante a replicação de vários vírus.

A técnica CRISPR pode ser aplicada tanto na ação de bloquear fatores importantes para a replicação viral com no em testes para potencializar fármacos já existentes e como estes medicamentos podem afetar o processo celular e de replicação viral.

Com base no artigo “**First isolation of West Nile virus in Brazil**”, responda as questões abaixo.

4) De acordo com a leitura do artigo citado acima, comente sobre a importância epidemiológica e molecular do estudo no Brasil.(1,0 pt).

- 1- Abordar sobre investigação de epizootias e vírus enzoóticos com risco de infecção em humanos;
- 2- Pode relatar sobre a co-circulação de Flavivirus em humanos de forma endêmica, dificultando a detecção por critérios laboratoriais;
- 3- Relatar sobre o conhecimento dos genótipos e/ou linhagens do WNV circulante utilizando análise molecular, como filogenia e relógio molecular, com objetivo de determinar o processo de dispersão do vírus e/o impacto na saúde pública

5) O West Nile virus (WNV) é um arbovírus, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, apresentando um ciclo de transmissão zoonótico envolvendo mosquitos e vertebrados suscetíveis. Sobre o primeiro isolamento do WNV no Brasil, leia as afirmativas abaixo e marque a alternativa correta: (1,0 pt).

I. A detecção sorológica do WNV no ano de 2015, proveniente de um caso de encefalite registrou a sua cocirculação junto com outros Flavivirus no Brasil em humano;

II. O primeiro isolamento do WNV em equinos mostrou a circulação enzoótica desse Flavivirus no Brasil;

III. Análise do relógio molecular demonstrou que o WNV isolado no Brasil tem como ancestral o mesmo tipo que circulou nos Estados Unidos da América entre os anos de 2000 a 2005;

IV. Análise filogenética do genoma completo do WNV possibilitou a identificação do genótipo circulante no Brasil, genótipo 1a, que compreendem os tipos virais circulantes na Europa, África e Américas;

V. O isolamento em células C6/36 e as alterações histopatológicas de tecido cerebral mostrou similaridade a dos Flavivirus encefalitogênicos e foram de extrema importância para corroborar com a investigação das encefalites em equinos que desencadeou na confirmação da circulação enzoótica do WNV no Brasil.

- a) II, III e IV estão corretas
- b) I, II e III estão corretas
- c) I, III e V estão corretas
- d) II e V estão corretas
- e) Todas estão corretas

6) Com base no artigo “30 years of dengue fatal cases in Brazil: a laboratorial-based investigation of 1047 cases”, analise as assertivas abaixo e marque a alternativa correta: (1pt).

1. O objetivo do trabalho foi descrever os aspectos epidemiológicos e laboratoriais de casos fatais suspeitos de infecção pelo *Vírus dengue* recebidos entre março de 1986 a Dezembro de 2015 por um laboratório de referencia regional do Ministério da Saúde no Brasil;
2. Durante o desenvolvimento do trabalho, foram utilizadas várias metodologias laboratoriais para confirmar os casos suspeitos de infecção pelo *Vírus dengue*, sendo que as amostras com até 7 dias de doença foram submetidas ao isolamento viral em células C6/36, RT-PCR convencional e em tempo real e Elisa de captura do antígeno NS1. Já as amostras com mais de 7 dias de doença foram submetidas aos testes sorológicos de Inibição da hemaglutinação e Elisa IgM e IgG anti-DENV;
3. Os resultados obtidos demonstraram que os casos fatais de infecção pelo *Vírus dengue* devido à infecção primária foram mais significantes do que as infecções secundárias, porém vários outros estudos demonstraram o contrário;
4. Os autores observaram que não existiu diferença significativa ao analisarem o desfecho fatal dos casos com o gênero dos pacientes, sendo que a proporção foi 1:1,08 de mulheres em relação aos homens.

- a. 1 e 3 estão corretas;
- b. **Todas as alternativas estão corretas;**
- c. 1, 2 e 3 estão erradas;
- d. 1 e 4 estão corretas;
- e. Todas as alternativas estão erradas.

7 Quais as duas principais conclusões que os autores do artigo “30 years of dengue fatal cases in Brazil: a laboratorial-based investigation of 1047 cases” obtiveram com os resultados apresentados na tabela abaixo: (1pt)

Table 4 Logistic models with logit links of association of dengue serotype and Age with immune response that lead to the evolution to a dengue fatal outcome

Variable Factor (vs.)	Factor	n (fatal/non-fatal)	OR (95% CI)	p value
Serotype				
Immune Responses				
'n' Primary Responses				
DENV-1 n = 57 (10/47)	Secondary	67 (5/62)	0.38 (0.14–0.96)	0.095
DENV-2 n = 62 (23/39)	Secondary	140 (46/94)	0.83 (0.49–1.41)	0.558
DENV-3 n = 138 (31/107)	Secondary	82 (19/63)	1.04 (0.60–1.79)	0.904
DENV-4 n = 8 (03/05)	Secondary	4 (04/00)	–	–
Age				
Immune Responses				
(years old) 'n' Primary Responses				
0–15 n = 46 (10/36)	Secondary	46 (24/22)	3.93 (1.86–8.62)	0.003
16–30 n = 63 (15/48)	Secondary	63 (10/53)	0.6 (0.28–1.26)	0.267
31–50 n = 86 (17/69)	Secondary	100 (19/81)	0.95 (0.52–1.76)	0.89
51–96 n = 37 (18/19)	Secondary	51 (18/33)	1.83 (0.89–3.83)	0.172

To calculate each logistic GLM, Death/Alive outcome was coded as binary variable. Odd ratios (COR), 95% confidence intervals (95%CI) and p-values were calculated using one GLM for each studied variable separately. Values highlighted in bold presented: OR > 1, values of OR contained into the 95%CI range and p-values < 0.05

1. Não foi observada associação entre o tipo de infecção (primária ou secundária) com o sorotipo do *vírus dengue* e a evolução para um desfecho fatal;
2. Crianças do grupo de idade de 0-15 anos com infecção secundária apresentaram um risco 4 vezes maior de um desfecho fatal em relação aos demais grupos de idade.

8 Marque as afirmativas com verdadeiro (V) ou falso (F), justificando as falsas:

(V) As crianças que apresentavam antigenemia para rotavírus foram acometidas por doença mais grave do que aquelas que sem antigenemia.

Resumo, página 1, linha 21.

(V) Os testes de ELISA e RT-PCR apresentaram sensibilidades semelhantes para detecção de antigenemia e RNAemia.

Discussão, página 8, linhas 1-2.

(F) O tipo G12P[8] é o que mais ocasiona antigenemia e RNAemia, visto que ele foi o genótipo mais frequentemente detectado.

Não há comprovação de que algum genótipo esteja mais associado a causar antigenemia, além de que o tipo G2 foi o único encontrado no soro. Discussão, página 6, tabela 2; página 8, linhas 61-62.

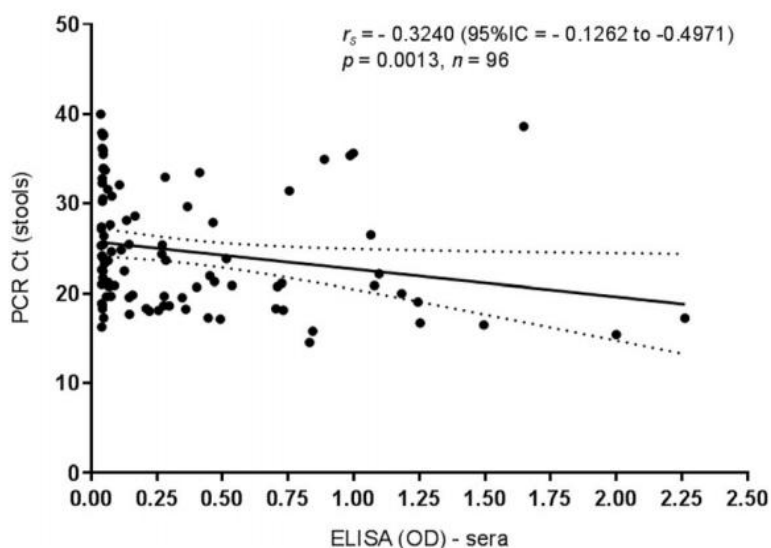
(F) Foi possível encontrar partículas virais infecciosas no soro, uma vez que foi detectado o RNA de rotavírus nesse tipo de espécime clínico.

Não foi possível demonstrar a presença de partículas virais infecciosas, uma vez que não foi realizado o cultivo celular. Discussão, página 9, linhas 20-22.

(V) As crianças que não receberam vacina contra rotavírus estavam mais susceptíveis a desenvolver antigenemia quando comparadas com aquelas que receberam pelo menos uma dose.

Resumo, página 1, linhas 14-15.

9) Responda as questões abaixo baseado na leitura do artigo “Rotavirus antigenemia as a common event among children hospitalised for severe, acute gastroenteritis in Belém, northern Brazil” de Justino et al. (2019):
De acordo com o gráfico abaixo, é correto afirmar que:



a) Há uma correlação positiva entre os valores de ct da PCR nas fezes e os níveis de antígenos no soro.

b) Há uma correlação positiva entre a carga viral encontrada nas fezes e os níveis de antígenos no soro.

c) A carga viral detectada nas fezes independe dos níveis de antígeno no soro.

d) Há uma correlação negativa entre a carga viral encontrada nas fezes e os níveis de antígenos no soro.

O gráfico demonstra que há uma moderada correlação negativa entre os valores de Ct do qRT-PCR e os níveis de antígenos no soro. Como o valor de Ct é inversamente proporcional a carga viral, então se conclui que há uma correlação positiva entre a carga viral encontrada nas fezes e os níveis de antígenos no soro (Discussão, página 8, linhas 27-28).

Observações:

- 1- As respostas das questões objetivas estão marcadas em amarelo;
- 2- As questões subjetivas estão com um espelho do conteúdo que deveria ter sido abordado com fonte vermelha.

COORDENAÇÃO DO PROCESSO SELETIVO MESTRADO PPGV 2020.