



CODIGO DA PROVA: MC048 - ICB0019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CONCURSO: MC-048

FOLHA DE RESPOSTA

Importante: O código da prova só será colocado na entrega da prova ao fiscal. As provas serão escaneadas e enviadas aos membros da banca avaliadora sem o nome do candidato.

• Pergunta nº 1 (folha 1)

Os estudos pré-clínicos consistem nas etapas de pesquisa por um fármaco que precedem aos ensaios clínicos com humanos, ou seja, são os estudos iniciais que visam entender como o candidato a fármaco age no organismo e no alvo molecular (ou farmacológico).

Geralmente, os estudos pré-clínicos se iniciam com o screening de moléculas, ou seja, a busca por moléculas com atividade. Essas moléculas podem ser de três fontes: a) moléculas oriundas de produtos naturais, as quais podem ser encontradas em plantas, animais e microrganismos. Elas apresentam uma diversidade estrutural muito importante, que foi adquirida ao longo de milhares de anos ao longo da evolução das espécies e podem consistir em metabólitos secundários dos organismos, sendo utilizadas para fins de defesa, por exemplo. b) moléculas sintéticas, as quais são produzidas através de reações químicas. Elas também podem consistir em moléculas "inspiradas" em produtos naturais, mas que foram modificadas ou melhoradas. c) moléculas dispostas em bibliotecas virtuais, podendo ser de origem natural ou sintética, mas que estão disponíveis em banco de dados (databases) para a realização de testes in silico, como o docking molecular, por exemplo. Ainda falando sobre as fontes de moléculas para teste, existe o banco de fármacos, como por exemplo, o Drugbank, que permite o teste de moléculas em



Comissão Organizadora do Concurso
Gabinete da Direção
ICB - UFRJ

• Pergunta nº 1 (folha 2)

etapas de ensaios pré-clínicos ou clínicos, ou ainda aprovadas para uso clínico. Essas moléculas podem ser estudadas através de ensaios ou estratégias *in silico*, visando o reposicionamento de fármacos.

Outra parte que é definida durante o *screening*, mas especificamente, antes de ser realizada, são os alvos farmacológicos. Algumas pesquisas se preocupam com a resposta, por exemplo, a analgesia em animais e depois vão investigar o alvo farmacológico envolvido no mecanismo de ação da molécula estudada. Outras pesquisas, se não a maior parte, definem um alvo farmacológico inicialmente e desenvolvem estratégias e ensaios para pesquisar fármacos ou potenciais fármacos com ação sobre ela. Os principais alvos farmacológicos pertencem a quatro principais classes:

a) receptores metabotrópicos: são receptores expressos na membrana plasmática das células, cujas subunidades transpassam a membrana 7 vezes, isto é, possuem 7 domínios transmembranares, além dos domínios C-terminal (intracelular) e N-terminal (extracelular). Esses receptores são acoplados à proteína G (sendo conhecidos como GPCRs) que se ativa em virtude da ligação do agonista. Existem alguns subtipos de proteínas G e cada uma delas está associada a uma via de sinalização com a ativação de diferentes segundos mensageiros. A proteína G_s (estimulatória) ativa a via da adenilato ciclase (ativando-a) e aumentando o AMP cíclico (AMPc). Já a proteína G_i (inibitória) inibe a AC, reduzindo os níveis de AMPc. Por outro lado, a proteína G_q (quiscente) induz a ativação da enzima fosfolipase C (PLC), produzindo diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). O IP_3 tem um receptor que é expresso no retículo endoplasmático (RE), liberando o cálcio para o meio intracelular. Exemplos de receptores metabotrópicos: receptores purinérgicos P_2Y e o receptor do GLP_1 .

b) receptores ionotrópicos: são receptores que formam canais iônicos, permitindo o fluxo de íons através da membrana em uma escala de milissegundos. Esses canais podem ser



• Pergunta nº 1 (folha 3)

ativados por ligantes, promovendo a sua abertura após a ligação de um agonista. Alguns agonistas fisiológicos incluem o ATP e GABA. Por outro lado, há alguns canais que podem ser ativados por voltagem (ex: canais de K^+ ativados por voltagem), temperatura (ex: TRP), entre outros.

A abertura dos canais iônicos pode promover uma mudança no potencial de membrana. Além disso, existem canais iônicos que são seletivos para um determinado íon.

Exemplos de ~~receptores~~ receptores ionotrópicos: receptores P2X.

c) receptores tirosina - quinase: são receptores expostos nas membranas celulares que se dimerizam após a ligação do agonista, são fosforilados nos resíduos de tirosina e amplificam o seu sinal através da fosforilação consecutiva de proteínas intracelulares. Exemplo desse receptor é o receptor de insulina, cujas falhas na fosforilação, podem levar à resistência à insulina.

d) receptores nucleares: podem ser encontrados no citosol ou no núcleo. Se estiverem no citosol, podem migrar para o núcleo após a ligação do agonista. Estão envolvidos com a transcrição gênica e possuem domínios para ligação ao DNA ("zinc fingers"). Exemplo de receptor nuclear: receptor de glicocorticoide.

Uma vez definido o alvo farmacológico e a bibliotecária ser utilizada, deve-se definir a estratégia de screening. Atualmente, existem duas importantes abordagens, a saber, screening de alta vazão (HTS, em inglês) e screening virtual (VS, em inglês). O screening em formato HTS foi muito explorado no século XX. Nela, são testadas moléculas através de ensaios celulares ou outros bioensaios utilizando-se placas de 96, ou mais, poços. Como é uma abordagem mais laboriosa, utiliza-se robôs para acelerar o processo de listagem dos compostos. Os ensaios podem ser de absorvância ou fluorescência, precisando-se utilizar de leitores aptos para placas.

Devido ao elevado custo de reagentes, é uma estratégia ^{mais} empregada pela indústria farmacêutica. Outras vantagens incluem o tempo para a realização dos testes e análises. No entanto, é possível observar o efeito biológico induzido pela molécula estudada.



• Pergunta nº 1 (folha 4)

Já os ensaios utilizando as técnicas de VS vêm emergindo nos últimos anos, especialmente com o melhoramento das poder computacional e da ascensão da inteligência artificial. Esses ensaios permitem uma análise das interações físicas entre um ligante (molécula) e um alvo farmacológico (proteína, geralmente). Dessa forma, eles permitem a afinidade de várias moléculas sobre a proteína estudada de forma mais rápida e com menos custos do que as estratégias HTS (embora, precisa-se considerar que há um custo computacional). A técnica de VS mais popular é o docking molecular e existem vários programas de docking que calculam a afinidade com base em parâmetros físicos, empíricos, entre outros. Há ainda programas que calculam a afinidade entre um ligante e a proteína com base em algoritmos de deep learning, como as redes neurais artificiais, aumentando a precisão. No entanto, essas análises in silico precisam ser validadas em modelos in vitro para confirmar se realmente existe o efeito biológico investigado. Porém, isso já economiza muito tempo e custos, já que os testes só serão realizados com um número pequeno de moléculas.

Uma das dificuldades do VS é a estrutura da proteína no formato tridimensional. Isso é uma grande limitação da técnica devido às dificuldades de se conseguir um cristal da proteína. Muitos trabalhos adotavam a técnica de modelagem por homologia para criar uma estrutura 3D da proteína a partir de outra (molde). Porém, atualmente a inteligência artificial já conseguiu trazer avanços para esse campo através do programa AlphaFold, que já está na versão 3. Ele consegue prever um modelo estrutural das proteínas com alta precisão.

Outra abordagem do VS é a baseada no ligante, em que é possível fazer um screening de moléculas que tenham uma semelhança estrutural com a molécula nativa. Essa semelhança é baseada no shape-Tanimoto, com pontuações que variam de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo do 1, essas moléculas são mais parecidas.

Essa estratégia pode ser útil no reposicionamento de fármacos e pode-se complementar essa abordagem de screening com a técnica de docking, fazendo uma abordagem híbrida.

• Pergunta nº 1 (folha 5).

Uma vez finalizada a etapa de screening, selecionam-se as moléculas que apresentarem os efeitos mais significativos (chamadas de hits). Em seguida, serão realizados demais testes in vitro para averiguar se elas de fato atuam sobre o alvo farmacológico ou se são "falsos positivos". Podem ser empregados ensaios para calcular o seu EC₅₀ (no caso de atividade agonista) ou IC₅₀ (no caso de antagonistas). Também pode-se avaliar se inibem ou ~~vão~~ ativam a via de sinalização, desvando, por exemplo, o nível de proteínas fosforiladas, citocinas liberadas, aumento de cálcio, entre outros. No caso de receptores ionotrópicos, pode-se realizar ensaios de eletrofisiologia para medir a abertura do canal iônico.

Realizada a caracterização in vitro dos hits, pode-se seguir para ensaios in vivo, em que serão avaliados o seus efeitos frente a um modelo animal com a doença ~~de~~ humana. Esse modelo irá mimetizar a doença e não é perfeito, dado a limitações como diferenças no metabolismo entre as espécies e, às vezes, a doença mimetizada não se parece tanto com o que ocorre com os humanos. Contudo, esses ensaios consistem em uma primeira "prova de conceito" de que a molécula estudada é biologicamente ativa. Com isso, dá para avaliar os biomarcadores séricos, a histologia dos tecidos e é possível fazer ensaios toxicológicos e obter as primeiras informações farmacocinéticas (pode-se coletar o soro dos animais e medir a quantidade da molécula).

As informações obtidas através dos ensaios in vivo podem ajudar a calcular a dose letal da molécula e observar se a molécula precisa ser otimizada quimicamente, para uma melhor resposta. Os ensaios pré-clínicos devem ser feitos com animais roedores (ex: camundongos e/ou ratos) e não ~~rodos~~ (ex: coelhos, cachorros ou primatas).

Cabe ressaltar que as moléculas com atividade e que apresentam uma melhor ~~absorção~~ absorção oral seguem os princípios / parâmetros de Lipinski: peso molecular < 500 Da, logP < 5; até 5 e 10 receptores e doadores de Hidrogênio. Contudo, moléculas oriundas de produtos naturais e antibióticos costumam apresentar violações à regra de 5 de

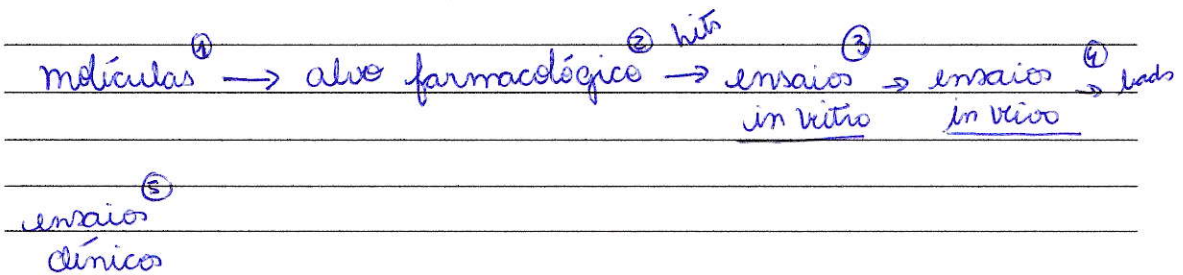


• Pergunta n.º 1 (folha 6).

Lipinski. Um exemplo são os imunossuppressores ciclosporina e tacrolimo.

Finalizadas as etapas descritas anteriormente, a molécula pode ser protegida (patente) e seguir para etapas de avaliação com pacientes e humanos saudáveis (ensaios clínicos).

Uma síntese do processo de descoberta de fármacos pode ser vista a seguir:



① Moléculas de origem natural ou sintética são testadas aos milhares.

② Os testes sobre o alvo farmacológico podem ser feitos através de técnicas de screening HTS ou VS.

③ As moléculas com a melhor resposta ^(hit) podem ser validadas quanto a atividade através de ensaios in vitro, os quais permitem o cálculo do EC₅₀ ou IC₅₀.

④ Os ensaios in vivo representam uma espécie de "prova de conceito" da atividade biológica da molécula estudada. Importante utilizar um número adequado de animais para obter margem estatística, além da randomização para evitar vieses.

⑤ Essas moléculas (hits) podem ser estudadas com maiores detalhes e até aprimoradas quimicamente (leads), seguindo para a última etapa de ensaios clínicos. No entanto, podem-se observar falhas na resposta dos testes com as moléculas em humanos, que é uma importante barreira ou limitação translacional dessas pesquisas, isto é, os compostos não funcionam em humanos. Isso pode ter relação com a má condução dos testes in vivo.



• Pergunta nº 2 (folha 1):

A farmacoterapia personalizada consiste em uma abordagem em que busca um tratamento eficaz para um determinado paciente. Ela é uma proposta que surgiu com a condução dos ensaios clínicos, em que foi observado que alguns pacientes não respondiam bem ao tratamento proposto. Cabe ressaltar que os ensaios clínicos randomizados consistem no padrão-ouro para avaliação o efeito de um fármaco.

A abordagem de farmacoterapia personalizada busca entender o porquê ~~que~~ ^{de} um tratamento não funciona. Dessa forma, investiga-se os hábitos do paciente, como dieta, exercícios, uso de outros medicamentos ou substâncias, entre outros. Além disso, busca-se investigar se ele possui alguma predisposição genética que seja possível iniciar uma ação de prevenção.

Exemplo: uma pessoa com predisposição à obesidade pode iniciar uma dieta e a prática de exercícios físicos regulares. Outro ponto é que entendendo a parte genética do paciente e observando que ele não responde a um determinado tratamento em virtude disso, é possível modificar o tratamento farmacológico dele de modo que ele tenha acesso a um que lhe traga / ofereça a resposta terapêutica. Isso é importante porque evita custos (para o paciente e para o sistema de saúde), evita efeitos adversos / desnecessários (traz maior segurança), aumenta a adesão ao tratamento e evita desperdício de tempo, uma vez que o tratamento inadequado terá a resposta terapêutica requerida.

No contexto das doenças metabólicas, é observada uma dificuldade no manejo do paciente de modo que ele obtenha a resposta terapêutica adequada, respondendo ao tratamento. Para isso, o estado-da-arte da farmacoterapia personalizada nas doenças metabólicas está associada ao uso das abordagens "ômicas":

a) Genômica: essa estratégia tem sido útil para mapear genes que possam ter seqüência mutações, como polimorfismos de base única (do inglês, SNPs). São observados diversos SNPs em pacientes portadores de doenças metabólicas, como



• Pergunta nº 2 (folha 2):

Obesidade, diabetes tipo 2 e dislipidemias. Usando técnicas de biologia molecular, é possível observar que os genes mutados da ApoE, receptor de insulina ou da via de sinalização da insulina, tornam esses pacientes mais suscetíveis às doenças e menos responsivos a determinados tratamentos que envolvam a via de sinalização alterada.

b) Transcritômica: analisa os produtos da transcrição através de técnicas de biologia molecular para investigar se ocorreram algum tipo de alteração no padrão de transcrição (isto é, estão mais ou menos transcritos) ou se estão sendo alvo de algum mecanismo de regulação epigenética.

c) Proteômica: analisa o padrão de expressão das proteínas através de técnicas de cromatografia e espectrometria de massas. Com isso, é possível observar se há alguma alteração no padrão de expressão dessas proteínas e investigar se isso está sendo responsável pela não responsividade do paciente. Esse padrão de expressão também pode ajudar a entender a etiologia da doença metabólica.

d) Metabolômica: analisa o padrão de ~~expressão~~ de metabólitos no organismo (ex: lipídios, aminoácidos, etc) através de técnicas de cromatografia e espectrometria de massas. Esses metabólitos podem estar sendo produzidos pelo corpo, como é o caso das adipocinas secretadas pelas células do tecido adiposo e serviriam como um biomarcador para a responsividade do tratamento farmacológico.

e) Microbiômica: analisa a microbiota intestinal dos pacientes, uma vez que alterações na microbiota estão relacionadas com o surgimento de doenças metabólicas.

A principal vantagem da farmacoterapia personalizada ~~é~~ é o custo dos testes genéticos, o que pode ser mais acessível no futuro. Assim, mais pessoas serão beneficiadas.



• Pergunta nº 2 (folha 3):
por essa abordagem mais precisa.



• Pergunta nº 3 (folha 1):

O diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) é uma doença crônica e de caráter autoimune. Alguns autoantígenos como a insulina e o antígeno 2 das ilhotas (IA2) são reconhecidos pelas células ~~do~~ do organismo e são apresentados para células TCD4⁺ via receptor de HLA classe II e/ou para células TCD8⁺ via receptor de HLA classe I. As células TCD4⁺ e TCD8⁺ orquestram uma resposta imunológica contra as células β -pancreáticas, destruindo-as por apoptose (principalmente). A destruição da massa das células β -pancreáticas, as quais são responsáveis pela secreção da insulina, sobrecarrega as células β sobreviventes, de modo que elas sofrem apoptose. Nesse cenário, a produção e secreção de insulina fica comprometida, levando a uma baixa insulina ao paciente e hiperglicemia.

O diagnóstico do DMT1 é comumente realizado na infância ou adolescência e os pacientes costumam apresentar a tríade de sintomas: excesso de sede, de fome e de urina (micção). Os dados epidemiológicos demonstram que o DMT1 afeta entre 2 a 5% da população mundial. Se não tratada corretamente, há chances de consequências graves como a nefropatia e retinopatia diabética, além de diminuição da sobrevivência do paciente.

Uma vez que há escassez de insulina produzida pelo organismo, em vista da destruição das células β -pancreáticas, responsáveis por essa função, o principal tratamento consiste na administração de insulina exógena através de via parenteral. Contudo, esse tratamento é desconfortável para o paciente, apesar de existirem diversas formas de insulina que tentam melhorar esse desconforto, como os dispositivos de liberação controlada da insulina. Apesar disso, as limitações da aplicação da insulina exógena também se referem ao controle da glicemia e da insulina ~~no~~ corporais (sêricos). Além da insulina, esses pacientes também precisam fazer dieta equilibrada evitando o consumo de alimentos com alta taxa de glicemia.

Nesse contexto, tem sido pensados outros tratamentos alternativos para essa doença, os quais não são listados a seguir:



• Pergunta nº 3 (folha 2):

a) Transplante de ilhotas pancreáticas: O transplante de pâncreas é um tipo de procedimento já realizado na medicina. Apesar disso, existem 2 limitações importantes que dificultam esse procedimento. O primeiro é a disponibilidade de órgãos para doação e a fila de espera existente. O segundo é que os pacientes transplantados terão de fazer uma terapia imunossupressora de forma crônica ao longo da vida, para evitar a rejeição do enxerto. Os imunossupressores atuais, especialmente os inibidores de calcineurina, promovem uma série de efeitos adversos que comprometem a qualidade de vida dos pacientes, como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, dislipidemia, entre outros. Dessa forma, estão sendo desenvolvidos estudos para o transplante de células da ilhota pancreática, tanto "sejuntas" quanto encapsuladas com material poroso (ex: alginato de sódio) de modo que permita a troca de nutrientes com o organismo, mas "protegidas" da resposta imune por causa das cápsulas. Essa é uma abordagem bastante promissora, mas que precisa ser ajustada / otimizada, pois há uma significativa perda de células que não chegam até o pâncreas e se aderem nesse órgão para recompor as ilhotas. Além disso, existe a questão sobre conseguir um número alto de células para esse tipo de transplante, o que não é tão fácil com as técnicas atuais de ~~biópsia~~ isolamento, as quais precisam ser melhoradas.

b) Técnicas de bioengenharia de tecidos acopladas à células-tronco ou primárias: essas técnicas tentam recrear um organoide de ilhota pancreática utilizando células primárias oriundas de biópsias ou células-tronco (ex: células-tronco mesenquimais, embrionárias ou pluripotentes induzidas). Esse organoide poderá ser implantado no paciente, mas também tem servido para o estudo do desenvolvimento da DMT1. Associado a dispositivos de microfluídica, que mimetizam a circulação tecidual, eles tentam mimetizar o microambiente fisiológico das ilhotas pancreáticas in vitro. O desenvolvimento



• Pergunta nº 3 (folha 3):

diversas técnicas têm sido úteis para entender como a DMT1 se desenvolve, já que quando ela ocorre e é diagnosticada, já está em uma etapa muito avançada de forma que os eventos iniciais são perdidos; até mesmo nos modelos animais de DMT1 induzidos quimicamente por estreptozotocina ou modelos que desenvolvem a doença espontaneamente (camundongos NOD ou biobreeding, por exemplo).

Em relação às células-tronco, ainda existe a questão de tentar diferenciar essas células para obter um número suficiente para o transplante celular.

c) Tratamento ^{com} imunoterapia: a terapia que tem se estudado nesse sentido é utilizar anticorpos anti-CD3 para destruir os linfócitos, prevenindo a destruição das células β -pancreáticas. Isso também deixaria os pacientes imunossuprimidos e mais suscetíveis à infecção. Seria possível obter um efeito semelhante utilizando imunossupressores (ex. inibidores de Calcineurina), no entanto, os pacientes ficariam suscetíveis aos efeitos adversos dessa terapia, previamente discutidos.

d) Tratamento genético: a ideia dessa abordagem é promover a edição gênica para reduzir a produção de autoantígenos ou o seu reconhecimento pelos receptores MHA ^{mal} funcionais, que reconheçam antígenos próprios. Contudo, ela ainda não evoluiu muito por conta de questões éticas.

