



# Concurso Público Fiocruz 2023

## Pesquisador em Saúde Pública

### Prova Discursiva

#### PE50

## Virologia Clássica e molecular

### Espelho de Resposta

**Pontuação de cada Questão Discursiva conforme Anexo II do Edital nº 3, de acordo com a Unidade detentora da vaga.**

Espera-se que o candidato, no desenvolvimento do tema, tenha feito considerações técnicas adequadas sobre os seguintes pontos:

#### Questão 01

O princípio das técnicas clássicas de isolamento, teste de neutralização e sua variação como o PRNT, Teste Imunoenzimático (ELISA) e de uma técnica molecular que é a PCR e sua variação, a PCR em Tempo Real (qPCR), demonstrando a importância das mesmas para o diagnóstico virológico.

O isolamento viral é a técnica padrão ouro para comparação com outros métodos, visto que demonstra que a infecção tem etiologia viral, pela presença do vírus no espécime clínico investigado. O princípio da técnica reside na característica do vírus de ser um parasita intracelular obrigatório e por isso, podem ser inoculados em um sistema hospedeiro susceptível, onde provocarão modificações fisiológicas como reflexo da replicação viral. Alguns sistemas de propagação podem ser utilizados, sendo sistemas hospedeiros obrigatoriamente vivos. Dentre eles o mais utilizado é a propagação viral em cultura celular, onde diferentes linhagens celulares podem ser utilizadas, podendo ser classificadas de acordo com sua capacidade de ancoragem (crescendo em aderência ou suspensão) ou tipo de cultivo (por exemplo se são primárias, diploides, contínuas). A propagação viral nas células inoculadas pode ser detectada pela observação do efeito citopático (ECP), que consiste nas alterações na morfologia celular que são induzidas pela biossíntese viral, as quais podem ser observadas em microscópio óptico. O efeito citopático pode ser caracterizado pelo aparecimento na cultura celular de por exemplo, vacuolização, pelo arredondamento celular, formação de sincícios, morte celular, presença de corpos de inclusão e granulação. A propagação viral também pode ser evidenciada pela detecção de proteínas ou ácidos nucleicos virais nas células inoculadas utilizando outras metodologias de diagnóstico. Diante do fato de que os vírus possuem tropismo por determinados

tipos celulares, precisa-se observar qual a suspeita clínica para a escolha do tipo celular para propagação. Alguns vírus não crescem adequadamente em cultura de células e por isso, outros sistemas são utilizados como linhagens celulares geneticamente modificadas. Outros sistemas de propagação que podem ser utilizados incluem a propagação viral em animais de laboratório e em ovos embrionados e nesses casos, a evidência da biossíntese viral será caracterizada pela presença de achados clínicos nos animais como paralisia a até mesmo a morte do animal. O tempo para isolamento de certos vírus pode ser longo e não atender a urgência clínica, por isso o isolamento viral pode ser acompanhado de testes sorológicos para detecção de anticorpos e assim confirmar a infecção viral.

O princípio do diagnóstico sorológico é baseado no fato de que a infecção viral irá elicitar a produção de anticorpos específicos os quais estarão presentes no soro do indivíduo. A detecção de anticorpos do tipo IgM refere-se à infecção recente. Já a presença de IgG pode significar contato prévio ou infecção recente no caso de conversão sorológica entre amostras pareadas. As técnicas sorológicas podem então ser aplicadas como uma medida indireta da infecção viral, para verificar se o indivíduo já foi infectado ou imunizado para determinados vírus e para estudar a epidemiologia de uma doença viral. O teste de neutralização está fundamentado no princípio de que partículas virais, quando interagem com anticorpos específicos, são neutralizadas e perdem a capacidade de infectar células susceptíveis e permissivas. Para o teste, vírus e anticorpos serão misturados e incubados para que ocorra a ligação Antígeno-Anticorpo (Ag-Ac). Essa mistura será inoculada no sistema de cultura celular e após incubação observada a presença de efeito citopático. Se houver a ligação Ag-Ac, o vírus será neutralizado e não conseguirá entrar na célula, desse modo não havendo a observação do efeito citopático. O teste de neutralização pode ser utilizado para identificação de vírus (utilizando anticorpos específicos) ou para a avaliação dos níveis de anticorpos (utilizando vírus conhecido para ligação ao soro do paciente). Em outra variação, no teste de neutralização por redução de placas (PRNT), a monocamada celular será coberta por uma camada de ágar ou carboximetilcelulose, evitando que o vírus se dissemine pela monocamada e a leitura será feita a partir do número de placas formadas após dias de incubação. A concentração do soro que reduz o número de placas em 50% (PRNT<sub>50</sub>) quando comparado ao soro livre de vírus, dará a medida do nível de anticorpos presente na amostra. O PRNT pode ser utilizado para avaliação da resposta de anticorpos pós-vacinais nos testes de imunogenicidade de protótipos vacinais. O teste imunoenzimático (ELISA) pode ser utilizado para a detecção de antígenos ou anticorpos. Seu princípio envolve a detecção da formação de um imunocomplexo Antígeno-Anticorpo (Ag-Ac), pelo uso de um anticorpo conjugado à uma enzima. O resultado do teste será baseado na medida espectrofotométrica da mudança de cor que é produzida pela reação da enzima sobre o substrato utilizado no ensaio. Para a detecção de antígeno, um anticorpo específico para o antígeno será fixado a um suporte sólido (placa, por exemplo) e o material teste pode ser diversos espécimes biológicos incluindo plasma e até sobrenadante de células infectadas. Para a detecção de anticorpo, um antígeno viral específico será fixado ao suporte sólido e o material teste a ser utilizado é o soro do paciente. Os ensaios imunoenzimáticos têm sido amplamente utilizados nos ensaios de triagem em situações epidemiológicas e na rotina para detecção do contato recente ou prévio com o vírus.

Ressalta-se que diversas variações do teste de ELISA podem ser utilizadas como o ELISA direto, indireto, sanduíche e competitivo.

O teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional tem como princípio a síntese *in vitro* de sequências específicas de DNA (amplicons), a partir de uma reação cíclica que requer um molde de DNA alvo, tampões, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), uma enzima termoestável (Taq DNA polimerase) e os iniciadores ou *primers* (pequenas sequências de DNA que delimitam a região a ser amplificada no DNA alvo). Para vírus de RNA, moléculas de RNA mensageiro são o molde para síntese da fita de DNA complementar (cDNA) à sua e que será então utilizada na técnica. Cada ciclo da PCR envolve três etapas: desnaturação (separação das fitas duplas de DNA), anelamento (pareamento da base de primers) e extensão (síntese da fita nova de DNA), observando as temperaturas ideais para cada etapa, cuja reação será realizada utilizando um termociclador para programar as temperaturas. Na PCR em tempo real (qPCR), o princípio é baseado no acompanhamento em tempo real, do progresso da amplificação do produto alvo, pela utilização de iniciadores e sondas marcados com moléculas fluorescentes, cuja mudança na fluorescência é lida pelo equipamento de alta sensibilidade para detecção de fluorescência. Três métodos são principalmente utilizados para detecção dos produtos na qPCR: SYBR Green que emite fluorescência quando se liga a fitas duplas de DNA, Taqman que usa a interação de sondas fluorescentes Reporter-R e Quencher-Q e FRET que utiliza o princípio da transferência de energia de ressonância fluorescente, automatizando a PCR, tornando o diagnóstico mais rápido que na PCR convencional. As técnicas de biologia molecular podem ser aplicadas em diversas áreas para a detecção de doenças virais, estudos sobre microRNAs, análise de SNPs, de expressão gênica, de mutações pontuais relacionadas a doenças, trazendo maiores informações sobre as doenças causadas por vírus.

## **Questão 02**

Conhecer quais são os sistemas de genética reversa utilizados em virologia, trazendo as definições de clones infecciosos e replicons, apresentando suas aplicações, a maneira de desenvolvimento e construção dessas ferramentas e identificando seu impacto para a virologia no que diz respeito ao aprimoramento das vacinas tradicionais e triagem de moléculas antivirais.

Um clone infeccioso viral pode ser caracterizado como um clone completo do DNA complementar (cDNA) de um vírus, clonado em um vetor de expressão, a partir do qual podem ser obtidos transcritos infecciosos *in vitro* ou *in vivo*, com a utilização de um promotor adequado. Com o desenvolvimento do clone infeccioso pode-se estudar a genômica funcional, a replicação e a expressão das proteínas virais e entender como se dão as relações vírus-hospedeiro. São base para a construção de abordagens vacinais, de vetores virais e para o desenvolvimento de plataformas de diagnóstico e para a triagem de drogas antivirais. A partir dos clones infecciosos também podem ser desenvolvidos sistemas de genética reversa denominados de replicons ou RNAs auto-replicativos, onde as sequências que codificam proteínas estruturais são geralmente deletadas do genoma viral, permitindo a replicação autônoma das proteínas não-estruturais sem a formação da partícula viral. O uso de determinados replicons permite o isolamento da

replicação do RNA viral, propiciando um mapeamento mais preciso das proteínas, sítios, e sequências de RNA diretamente envolvidas na replicação viral.

A abordagem tradicional para produzir clones infecciosos envolve a geração de fragmentos de RNA viral por RT-PCR e depois a clonagem desses fragmentos em um plasmídeo bacteriano. No entanto, essa abordagem de clonagem pode ser desafiadora devido à instabilidade do genoma viral em bactérias (pela presença de promotores bacterianos crípticos no genoma viral), como já demonstrado, por exemplo para os flavivírus e alfavírus. Para evitar essa instabilidade algumas estratégias podem ser utilizadas e uma delas inclui manter o genoma viral dividido em vários plasmídeos, combinando esses fragmentos genômicos *in vitro* e utilizando o produto para transfecção direta a partir de clones baseados no promotor de citomegalovírus (CMV) para a polimerase II em células susceptíveis. Outra abordagem que pode ser citada para a construção e recuperação de vírus a partir dos sistemas de genética reversa consiste em gerar transcritos de RNA *in vitro* a partir de um clone de cDNA, o qual contém o genoma completo (*full-length*) do vírus, utilizando um promotor de RNA polimerase de procaríoto (bacteriófago- T7 ou SP6), fazendo posteriormente a transfecção dos transcritos em células eucariotas susceptíveis para recuperação da partícula. Demais sistemas de genética reversa que tem sido utilizados para a transfecção direta em células eucariotas permissivas ou para produzir RNA infeccioso usando transcrição *in vitro* e que retiram os sistemas bacterianos do processo e incluem a montagem de Gibson, amplicons subgenômicos infecciosos (ISAs), clonagem por polimerase de extensão circular (circular polymerase extension cloning/reaction- CPEC/CPER), amplificação por círculo rolante (*rolling circle amplification*- RCA) e reação em ciclo de replicação (*replication cycle reaction* -RCR). No caso da necessidade de manter os sistemas para produção de clones infecciosos em bactéria podem ser citadas alternativas como uso de cromossomos artificiais bacterianos (BACs) com baixo número de cópias, o uso de leveduras para recombinação homóloga e a introdução de mutações sinônimas em promotores bacterianos crípticos para evitar a transcrição por polimerases bacterianas.

Sistemas de genética reversa têm sido uma importante ferramenta para o desenvolvimento de vacinas e rastreamento de moléculas antivirais, a partir de modificações no genoma viral e geração de partículas recombinantes. Uma das abordagens convencionais para o desenvolvimento de vacinas utiliza a atenuação de patógenos por meio de passagens consecutivas *in vitro* (utilizando cultivo celular) para obter cepas vivas atenuadas. No entanto, o risco potencial de reversão da virulência das abordagens tradicionais coloca os sistemas de genética reversa como uma importante ferramenta para a manipulação do genoma viral, construindo e otimizando mutantes virais para o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas mais seguras a partir de clones infecciosos. Em cepas altamente patogênicas a tecnologia fornece maneiras de modificar genes para remover os determinantes de virulência. Os sistemas de genética reversa também permitem o desenvolvimento de vetores virais, que expressam genes alvos como proteínas/epítomos imunogênicos, não apenas para vacinas virais, mas para entrega de epítomos de outros patógenos microbianos. A partir dos clones infecciosos também podem ser desenvolvidos sistemas de genética reversa chamados de replicons, que por apresentarem os elementos necessários para a replicação autônoma dentro da célula, faz deles excelentes ferramentas para a expressão de genes heterólogos em altos níveis e de maneira

transiente (proteínas ou epítomos) e como vetores para propósitos terapêuticos e profiláticos, sendo base por exemplo para o desenvolvimento de vacinas de RNA auto-replicativas. Para a triagem de antivirais, os testes tradicionais são baseados no monitoramento da inibição da replicação através da observação dos efeitos citopáticos, quantificação da produção viral por ensaio de placas, ou pela avaliação da replicação do RNA viral por RT-PCR. As tecnologias em genética reversa abriram margem para o desenvolvimento de novas estratégias para a triagem de moléculas antivirais, com o uso de vírus vivos, VLPs (*Virus Like Particles*) e replicons virais. A utilização de replicons que expressam genes repórter como GFP (*Green Fluorescent Protein*), Luciferase e Neomicina já foi demonstrada para diversos vírus com RNA de cadeia positiva e negativa, os quais são utilizados como marcadores da eficiência de expressão viral. Com a clonagem de um gene repórter no genoma viral ou em replicons sub-genômicos, é possível triar células transfectadas e analisar a expressão do gene repórter como medida direta para monitorar a supressão da replicação viral por potenciais inibidores. Também é possível desenvolver tecnologia de ponta para a triagem de antivirais a partir da construção de linhagens celulares contendo replicons repórteres, sendo os ensaios baseados em células ideais para inibidores que agem na transcrição e replicação viral pois permitem a avaliação do efeito citotóxico dos compostos antivirais em investigação. Os sistemas de genética reversa apresentam importante papel no desenvolvimento de testes de triagem em larga escala, sendo mais rápidos e permitindo o uso de várias moléculas em único ensaio em relação as abordagens tradicionais.