



Concurso Público Fiocruz 2023

Pesquisador em Saúde Pública

Prova Discursiva

PE70

Biologia Celular e Molecular de microrganismos

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

As observações clínicas sugerem que a paciente apresente Mielopatia Associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical, manifestação neurológica associada à infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1). O diagnóstico pode ser realizado através de um ensaio imunoenzimático (ELISA) de terceira geração, no qual antígenos específicos (peptídeos sintéticos e/ou proteínas recombinantes de HTLV-1) são adsorvidos a uma placa de poliestireno, onde são incubados com os soros em teste. Os anticorpos específicos para as proteínas do HTLV-1 (presentes no soro) irão se ligar aos antígenos adsorvidos na placa. Em seguida um anticorpo conjugado a HRP anti-IgG será adicionado. Após adição de um substrato há a emissão do sinal colorimétrico que será analisado em um espectrofotômetro. A reação é definida como positiva por intensidade colorimétrica, medida em densidade ótica, a partir de um valor de corte definido ou cut-off. O resultado positivo indica a presença de anticorpos contra o HTLV-1, enquanto o resultado negativo a ausência desses anticorpos. A confirmação do diagnóstico pode ser realizada por outro método sorológico, cujo mais utilizado é o Western blotting (WB). No WB também se detecta a presença de anticorpos contra o HTLV-1 a partir de amostras de soro ou líquido cefalorraquidiano. Para tal, diferentes antígenos virais, separados por meio de eletroforese, segundo seu peso molecular e carga elétrica. No WB são utilizados lisado viral total de HTLV-1 e proteínas recombinantes do envelope de HTLV-1 (rgp 41-I) e HTLV-2 (rgp 46-II), além da glicoproteína transmembrana comum a ambos os vírus (GD 21). Para a confirmação também pode ser empregada uma técnica molecular de PCR em tempo real (quantitativa), que detecta o genoma viral inserido na célula hospedeira (DNA pró-viral). Para tal, DNA total deverá ser extraído da amostra utilizando kit de extração para sangue total. E a concentração de DNA será medida em um espectrofotômetro. Para averiguar a pureza do material será usada a razão das densidades óticas em 260 nm e 280 nm, respectivamente. Razões próximas a de 1,8 são consideradas ótimas. A amplificação do gene que codifica a proteína viral Tax será realizada em aparelho de PCR em tempo real utilizando um Kit Taqman desenhado com a sequência específica para amplificação do alvo. Para a quantificação uma curva padrão deverá ser gerada utilizando o gene constitutivo β -globina e o gene alvo a partir de DNA obtido de células de linhagem celular permanentemente infectada que contém um nº de cópias

do provírus do HTLV-1 conhecida. A carga proviral em 10^4 células é igual ao {número de cópias do gene tax/(número de cópias do gene β -globina/2)} X 10^4 .

Questão 02

Já estão bem estabelecidos como fatores de risco associados ao surgimento de doença relacionada à infecção pelo HTLV-1, o aumento da carga pró-viral e dos níveis da quimiocina CXCL10. No entanto, encontrar novos biomarcadores pode representar um avanço no manejo dos pacientes, orientar ações preventivas e de diagnóstico, bem como promover o monitoramento do uso de novos medicamentos. Os novos biomarcadores podem ser detectados através de amostras de fácil obtenção como sangue, saliva ou urina, reduzindo os efeitos invasivos. As análises “ômicas”, como a genômica, a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica, vem produzindo uma grande quantidade de dados, que impulsionam a busca de novos biomarcadores de doenças humanas. A partir de amostras obtidas do sangue periférico ou líquido cefalorraquidiano células (frescas ou congeladas) podem ser isoladas por separação de células ativadas por fluorescência (FACS), ou pela utilização de “beads” magnéticas. A partir de um grupo de células ou de uma célula única (“single-cell”) o RNA extraído, por exemplo, que servirá como base para a elaboração de uma biblioteca a ser usada no sequenciamento. O controle de qualidade é uma parte crucial deste processo para garantir uma representação precisa de transcriptomas ou epigenomas individuais. Existem diferentes sequenciadores comerciais podem ser empregados para tais estudos. A principal consideração é a compatibilidade com métodos específicos de preparação de bibliotecas e a determinação se os objetivos da pesquisa são mais adequados para plataformas de “long-reads” ou “short-reads”. Os conjuntos de dados produzidos são grandes e complexos e podem exigir infraestrutura computacional específica e conhecimentos de análise. Em seguida, os achados deverão ser validados através de outras abordagens metodológicas. As análises poderão revelar genes diferencialmente expressos em associação a um estágio clínico do paciente, podendo ser empregado como biomarcador.

Já a partir do plasma, saliva ou urina podem ser utilizadas estratégias de proteômica e metabolômica, por exemplo. Plataformas analíticas, como LC-MS/MS, CE-MS e GC-MS podem ser empregadas. A espectrometria de massa utilizada para análise de amostras complexas pode ser dividida em três tipos principais: nanofluxo, microfluxo e fluxo padrão – cada um dos quais se diferencia pela escolha do tamanho da coluna e da taxa de fluxo. Assim, como nas técnicas moleculares os conjuntos de dados exigem a análise computacional específica e a validação posterior dos dados. As proteínas como a calgranulina B, beta-2-microglobulina, osteonectina, receptores do fator de necrose tumoral solúveis, apolipoproteína A-II e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e a quitotriosidase vêm sendo analisadas como potenciais biomarcadores para doenças associadas à infecção por HTLV-1.

O candidato pode dar exemplos de plataformas para realização de análise transcriptômica e/ou proteômica, além de estratégias de análise do conjunto de dados a serem utilizadas.