



FIOCRUZ

Concurso Público Fiocruz 2023

Pesquisador em Saúde Pública

Prova Discursiva

PE 38

Microbiologia molecular com ênfase em bioinformática

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

Para o caso, sugere-se que seja avaliada como correta a resposta que aponte informações sobre:

Processo de extração e purificação do RNA: O processo de extração inclui a exposição do ácido nucleico por meio do rompimento da membrana e parede celular, o qual pode ser realizado por lise mecânica, enzimática ou química. O processo de purificação isola o RNA de outros componentes celulares, de modo que o material fique concentrado e armazenado em água ou tampão, este pode ser realizado com o uso de fenol/clorofórmio e precipitação em etanol, colunas de centrifugação ou beads magnéticas.

Processo de controle de qualidade da etapa de extração e purificação do RNA: O candidato deve apontar informações sobre o processo de quantificação do RNA, o qual pode ser realizado por espectrofotometria, fluorometria, eletroforese capilar ou análise microfluídica; integridade do RNA por meio de eletroforese e pureza por espectrofotometria.

Processo de transcrição reversa: O processo de transcrição reversa realiza a síntese de um DNA complementar (cDNA) a partir de um RNA molde. O candidato deve apontar informações sobre os equipamentos e reagentes usados durante o processo de transcrição - RNA molde, enzima transcriptase reversa, DNTPs, primers (iniciadores oligo(dT), aleatórios ou com sequência específicos), tampão com íon bivalente, bem como, discorrer sobre boas características de uma enzima transcriptase reversa (estabilidade térmica, baixa atividade de RNase H e linearidade).

Processo de qPCR: O candidato deve apontar informações sobre a escolha do ensaio em uma ou duas etapas, uso de genes endógenos como gene de referência. Reagentes usados durante o processo de amplificação (DNA molde – cDNA; enzima DNA polimerase, DNTPs, iniciadores, tampão com íon bivalente e agente fluorescente com foco em sondas de hidrólise - sequências específicas que se ligam ao DNA alvo; Essas sondas apresentam na

extremidade 5' um fluoróforo (*reporter*) e na extremidade 3' uma molécula que absorve a fluorescência (*quencher*). Quando juntos, esses reagentes trocam energia e toda a luz emitida pelo fluoróforo é absorvida pelo *quencher*. Dessa forma, o sistema óptico do equipamento não é capaz de detectar fluorescência no tubo de reação. Por outro lado, se a reação for capaz de gerar produtos (amplicons), a sonda irá hibridizar-se com esse alvo gerado e ficará exposta à atividade de exonuclease da polimerase. Como consequência, essa sonda será degradada e o fluoróforo ficará distante do *quencher* que agora não mais será capaz de absorver a luz emitida. O nível de fluorescência aumenta de modo proporcional ao aumento do número de cópias do alvo da reação.

Análise dos dados: O candidato deve apontar informações sobre a quantificação relativa – proporção ou relação do número de cópias do alvo na amostra. Para um ensaio focado na expressão de genes por exemplo, a partir do gráfico gerado ao término da reação, é traçada uma linha de maneira paralela ao eixo referente ao número de ciclos, na altura em que se inicia a fase exponencial da amplificação gênica (início da elevação exponencial na emissão da fluorescência). Este parâmetro representa o limiar de detecção, ou seja, o número mínimo de ciclos para amplificação, e é denominado *threshold*. O ponto em que o *threshold* cruza com a linha de amplificação da amostra, permite determinar o número de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência gênica-alvo presente no DNA de cada amostra. Este valor é denominado Ct (*Cycle Threshold*) e permite a quantificação relativa do DNA de cada uma das amostras, após ser corrigido pelos Ct dos genes-controle endógenos e das amostras-controle. O *cycle threshold* é proporcional ao logaritmo da quantidade inicial de expressão do gene-alvo em uma determinada amostra, ou seja, **quanto menor for o número inicial do Ct obtido do gene-alvo na amostra, é porque houve maior amplificação do gene-alvo e, consequentemente, ele apresenta maior expressão**. O cálculo de expressão relativa é realizado por $2^{\Delta\Delta Ct}$, onde são usados os valores de *cycle threshold* do gene alvo e do gene endógeno.

Questão 02

O candidato deve saber que a taxonomia polifásica é um sistema ou uma abordagem que integra características fenotípicas, como macro e micromorfologia, e quimiotaxonômicas, além de caracterização genômica e proteômica na identificação de microrganismos.

A morfologia e quimiotaxonomia utilizam principalmente meios de cultura e diferentes condições de cultivo. A partir do cultivo, podem ser observadas características macroscópicas e microscópicas, induzir a produção de estruturas de reprodução em fungos filamentosos, como esporangióforos, conidióforos, macro e microconídios, além de induzir clamidosporos e filamentação em leveduras. Meios de culturas específicos podem determinar o perfil assimilativo de fontes nutricionais com carbono e nitrogênio, e induzir a produção de enzimas e metabólitos.

A genômica requer cubas eletroforéticas para avaliar integridade, pureza, e em alguns casos quantificar, termocicladores para amplificação do alvo, e sequenciadores para sequenciamento de genes. Essa técnica estima a similaridade genética entre pares de sequências do genoma do agente etiológico e de genomas de isolados de referências, permitindo a identificação.

A proteômica requer métodos baseados em espectrometria de massas, sendo o MALDI-TOF MS o mais robusto e utilizado. Essa técnica físico-química baseia-se na ionização de macromoléculas orgânicas, principalmente proteínas, que serão comparadas com banco de dados construídos com espectros de referência para identificação do agente etiológico.