

Aula 00

*FioCruz - Tecnologista em Saúde Pública
(Perfil Tecnologias aplicadas à Pesquisa
em Saúde e Processos Biotecnológicos -
TE50) Conhecimentos Específicos - 2023
(Pós-Edital)*

Autor:

Ana Cristina dos Santos Lopes

03 de Janeiro de 2024

Sumário

Biologia Molecular.....	3
Considerações Iniciais.....	3
1 - Extração e purificação do DNA.....	4
2 - Enzimas de restrição.....	4
3 - Hibridização.....	6
3.1 – Southern blot.....	6
3.2 – Northern blot.....	7
3.3 – Western blot.....	7
3.4 - Hibridização in situ.....	8
3.5 - FISH.....	9
3.6 - Hibridização por microarray.....	9
4 - Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	11
4.1 – PCR convencional.....	13
4.2 – PCR em tempo real (quantitativa).....	14
4.3 – PCR nested.....	14
4.4 – PCR multiplex.....	15
4.5 – PCR com transcrição reversa.....	15
4.6 – PCR RFLP.....	16
5 - Eletroforese.....	16
6 - Teste de Paternidade.....	17
7 - NASBA/TMA.....	19
8 - bDNA.....	20



9 - Teste de ácido nucleico (NAT)	21
Considerações Finais	23
Lista de Questões	24
Questões Comentadas	34
Gabarito	50
Referências.....	51



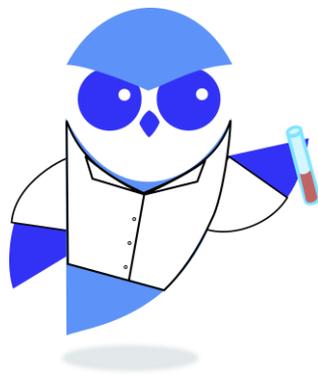
BIOLOGIA MOLECULAR

Considerações Iniciais

A biologia molecular envolve a realização de várias técnicas no intuito de compreender os mecanismos moleculares das funções biológicas. É uma disciplina intimamente relacionada à genética, uma vez que a maioria das técnicas de biologia molecular busca compreender os mecanismos moleculares por trás dos mecanismos genéticos, principalmente a composição, estrutura e funcionamento das moléculas de **DNA, RNA e proteínas**.

Nesta aula iremos estudar as principais técnicas de biologia molecular que são cobradas em provas de concurso.

Preparados? Então vamos começar.



Boa aula!



1 - Extração e purificação do DNA

Como muitas das técnicas de biologia molecular analisam o DNA, a primeira etapa que temos que realizar ao obter uma amostra biológica é extrair o material genético presente nesta amostra e purificá-lo. Hoje em dia, a maioria dos laboratórios utiliza **kits comerciais** para realização da extração e purificação, porém é possível realizar estes procedimentos com ingredientes simples, como detergente, sal de cozinha e etanol (apesar de o rendimento e a qualidade da amostra serem inferiores).

As três etapas básicas da extração de DNA são 1) lise, 2) precipitação e 3) purificação.

1ª etapa: Lise

Nesta etapa, as **membranas celulares são lisadas** (rompidas) para liberar o DNA. Existem duas maneiras de fazer isso, por ação **mecânica** (agitação, maceração, sonicação) ou **química** (detergentes e enzimas).

2ª etapa: Precipitação

Ao final da etapa de lise, o DNA se encontra livre, porém está misturado com detritos celulares. A precipitação separa o DNA desses detritos. Primeiro, os íons **sódio** (Na^+) **neutralizam as cargas negativas nas moléculas de DNA**, o que as torna mais estáveis e menos solúveis em água. Em seguida, é adicionado **álcool** (etanol ou isopropanol), que faz com que o **DNA precipite** na solução aquosa, porque não é solúvel em álcool.

3ª etapa: Purificação

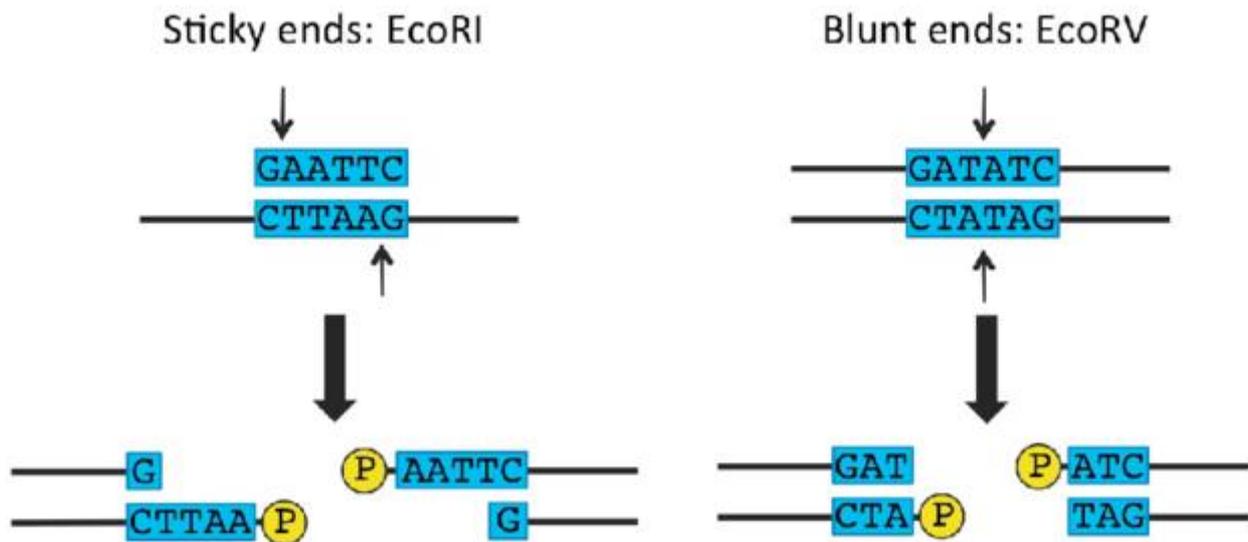
Depois que o DNA foi separado da fase aquosa, ele pode ser lavado com álcool para remover materiais indesejados e detritos celulares restantes. Nesse ponto, o DNA purificado é geralmente redissolvido (**eluído**) em água para facilitar o manuseio e o armazenamento.

2 - Enzimas de restrição

As **enzimas de restrição** são **endonucleases** capazes **reconhecer** e **clivar** (cortar) o **DNA fita dupla** em pontos específicos para formar fragmentos menores. Os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição são **palíndromos** (ambas as fitas têm a mesma sequência em orientação antiparalela). Diferentes enzimas reconhecem diferentes sítios palindrômicos, que podem variar de tamanho (geralmente de **4 a 8 bases**).

Há dois tipos de clivagem: **extremidades cegas** ou "**blunt ends**" (os dois cortes ocorrem no eixo de simetria da sequência específica) e **extremidades coesivas** ou "**sticky ends**" (os cortes são feitos simetricamente, porém fora do eixo de simetria).





Legenda: Sítios de restrição com extremidades coesivas (sticky ends) e extremidades cegas (blunt ends).
Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Type-of-DNA-ends-generated-by-restriction-enzymes-Representative-examples-of-restriction_fig1_315873372.

Esta técnica é empregada como forma de preparação da amostra de DNA para outros procedimentos analíticos, como a **hibridização** e a reação em cadeia da polimerase (**PCR**) **RFLP**.



(Quadrix - SEDF - 2018) No que concerne às técnicas de engenharia genética, julgue o item que se segue.

O DNA extraído pode ser manipulado por enzimas de restrição, que têm a função de ligar pedaços de DNA de organismos diferentes.

Certo

Errado

Comentários:

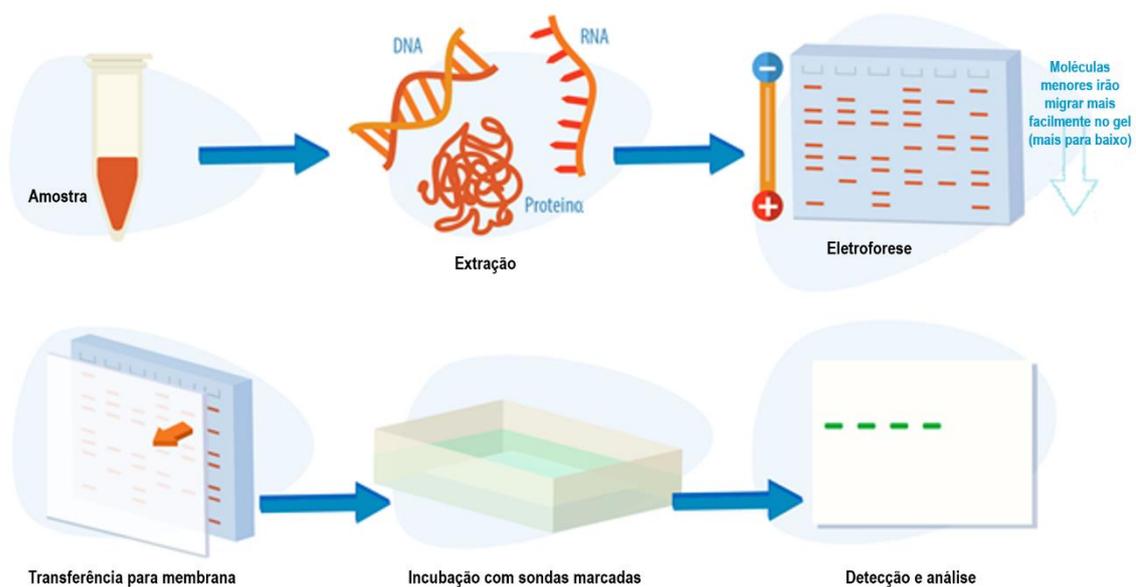
As enzimas de restrição têm a função de **clivar (cortar)** a molécula de DNA, não de ligar fragmentos. A enzima que liga fragmentos de DNA é a DNA ligase.

Gabarito: Errado.

3 - Hibridização

A técnica de hibridização consiste no **pareamento de segmentos homólogos** (complementares) marcados no material genético pesquisado.

As diferentes técnicas de hibridização seguem os mesmos procedimentos básicos. Primeiro o material genético (DNA, RNA ou proteína) é **extraído** da amostra e purificado. Em seguida ele é **digerido** por enzimas de restrição e realiza-se uma **eletroforese** do material resultante. A seguir o material é transferido para uma **membrana** de nitrocelulose ou nylon e por fim realiza-se a **hibridização** com **sondas marcadas** com **quimioluminescência** ou com material **radioativo**.



Legenda: Eletroforese em gel, transferência, incubação e detecção.

Fonte: <https://www.labmanager.com/insights/southern-vs-northern-vs-western-blotting-techniques-854>

Veremos nos próximos tópicos diferentes aplicações da técnica de hibridização.

3.1 – Southern blot

O *southern blot* é usado para identificar regiões no **DNA** através de sondas com homologia à sequência alvo de ácido nucleico em estudo. Nesta técnica, inicialmente o DNA genômico é digerido por enzimas de restrição. Os fragmentos são separados por eletroforese e depois o DNA é desnaturado e transferido para uma membrana de nylon. Por fim, o DNA é hibridizado com sondas de ácidos nucleicos marcadas por fluorescência, quimioluminescência ou radioatividade.

3.2 – Northern blot

O *northern blot* é usado para analisar o **RNA** de um organismo. Esta técnica é aplicada na identificação da expressão de determinados genes em diferentes tecidos ou células e para checar se toda a sequência de um cDNA foi clonada comparando com o tamanho do RNAm.

3.3 – Western blot

O *western blot* é capaz de detectar pequenas quantidades de uma **proteína** específica em uma mistura complexa de proteínas. Esta técnica utiliza como sonda **anticorpos policlonais ou monoclonais** para detectar antígenos específicos. Ou seja, o *western blot* se baseia na especificidade da ligação entre antígeno e anticorpo para identificação e quantificação de moléculas.

A técnica de *western blot* foi explicada mais detalhadamente na aula de imunologia.



Western blot no diagnóstico do HIV

O diagnóstico do HIV se inicia pela realização de um teste de **ELISA**, que é um teste de **triagem** com **alta sensibilidade**. Caso o resultado do ELISA seja positivo para HIV, realiza-se a **confirmação** do diagnóstico pela técnica de **Western blot**, que é mais **específica**.

Um resultado positivo para HIV por *Western blot* irá detectar as seguintes proteínas: gp 160, gp120, gp 41 e p24.



(IADES - Fundação Hemocentro de Brasília - DF - 2017) Assinale a alternativa que apresenta uma amostra positiva para HIV-1, segundo os critérios para interpretação dos resultados de *Western-blot*.

A) gp 160, p31 e p66.



- B) gp 41 e p31.
- C) p55 e p24.
- D) gp 160, gp120, gp 41 e p24.
- E) gp 180, gp 120, gp51, p55 e p31.

Comentários:

Um resultado positivo para HIV por *Western blot* irá detectar as seguintes proteínas: gp 160, gp120, gp 41 e p24.

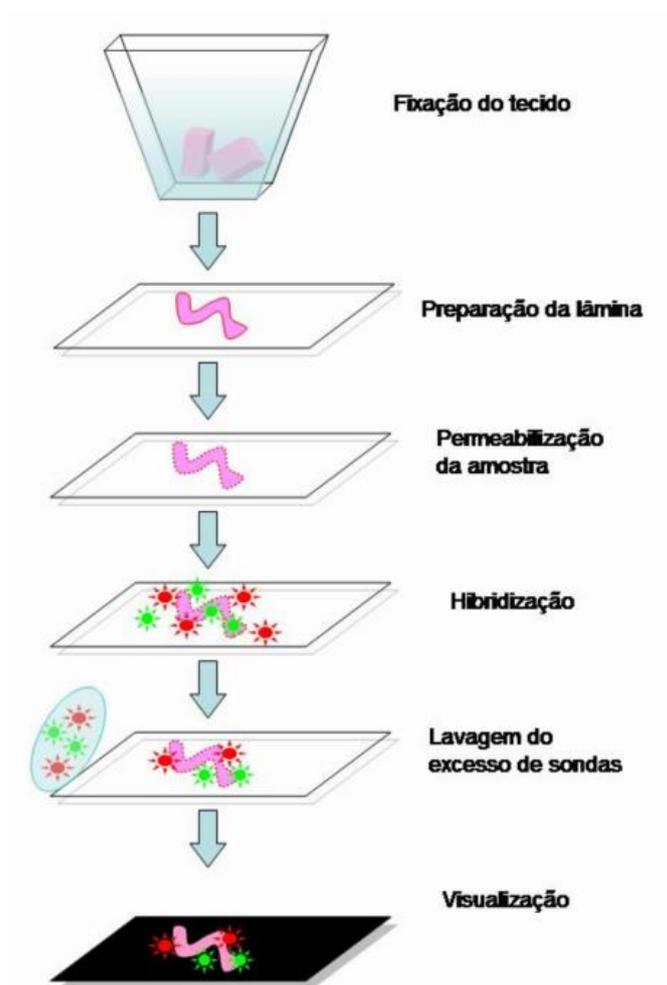
Gabarito: letra D.

3.4 - Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* é um tipo de hibridação na qual uma **sonda de ácidos nucleicos marcada** é utilizada para **localizar** uma sequência específica de **DNA** ou **RNA** em uma amostra de **tecido**, ou em **cromossomos** (no caso do DNA).

A sonda utilizada deve ser **complementar** à sequência alvo. Dentre os marcadores utilizados nesta técnica, pode-se citar: radioisótopo 35 do enxofre, digoxigenina e radioisótopo 33 do fósforo. A hibridização *in situ* difere da imunohistoquímica, que é utilizada para localizar proteínas em seções de tecido.





Legenda: Principais etapas da hibridização fluorescente in situ.

Fonte: Neves; Guedes, 2012. Hibridização in situ fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária.

3.5 - FISH

A técnica de **FISH** (do inglês *fluorescence in situ hybridization*) é uma variação da técnica de hibridização *in situ* que utiliza **sondas** de **DNA** ou **RNA** marcadas com **fluorescência** complementares a sequências presentes em células e tecidos. É comumente chamada de **citogenética molecular**, pois é muito usada para detectar e localizar sequências específicas de DNA (ou a ausência delas) em **cromossomos**, mas também pode ser usada para detecção de RNA em células ou tecidos.

3.6 - Hibridização por *microarray*

Um **microarray** (ou **microarranjo**) é uma ferramenta usada para **detectar a expressão de milhares de genes ao mesmo tempo**. *Microarrays* de DNA são como lâminas de microscópio impressas com milhares



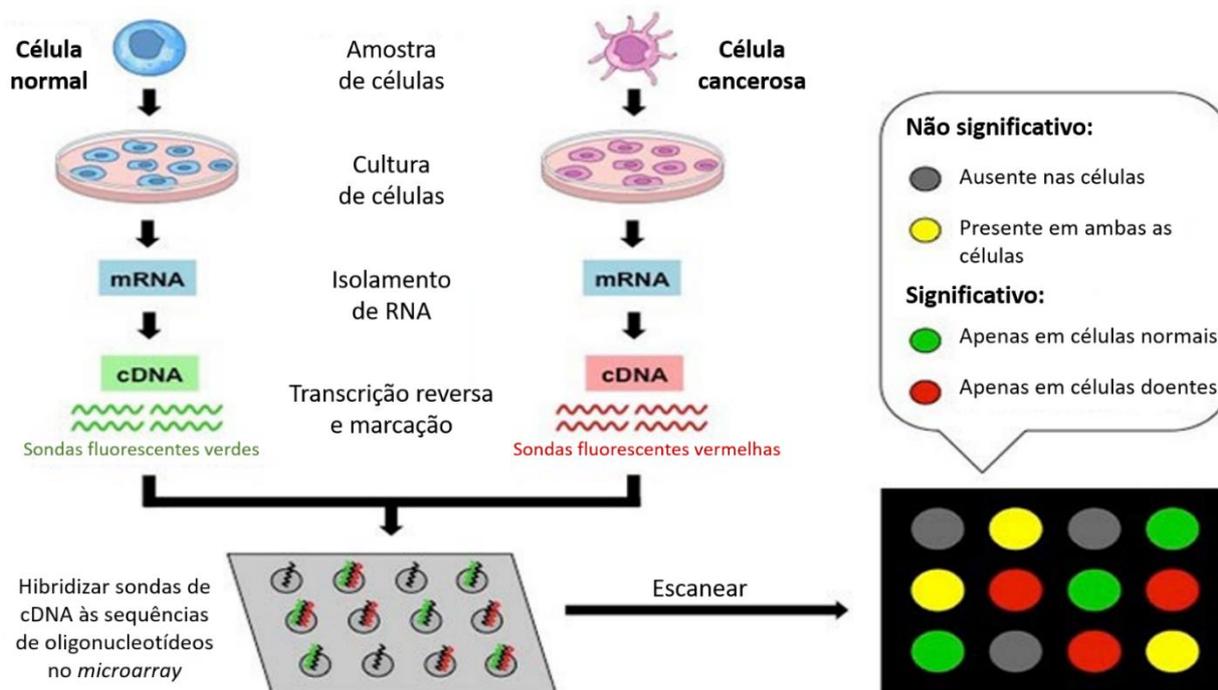
de pequenos pontos em posições definidas, cada um contendo uma sequência de DNA conhecida. Essas lâminas também são chamadas de **chips genéticos** ou **chips de DNA**. As moléculas de DNA ligadas a cada lâmina atuam como sondas para detectar a **expressão gênica**, também conhecida como **transcriptoma**.

Para realizar uma análise de *microarray*, as moléculas de mRNA são geralmente obtidas de uma **amostra teste** e de uma **amostra controle**. Por exemplo, a amostra controle pode ser coletada de um indivíduo saudável e a amostra teste pode ser coletada de um indivíduo com uma doença, como o câncer.

As duas amostras de mRNA são então convertidas em DNA complementar (**cDNA**) e cada amostra é marcada com uma **sonda fluorescente de cor diferente**. Por exemplo, a amostra teste de cDNA pode ser marcada com um corante fluorescente vermelho, enquanto que o cDNA controle pode ser marcado com um corante fluorescente verde.

As duas amostras são então **misturadas** e deixadas para se ligar com a lâmina de *microarray*. O processo no qual as moléculas de cDNA se ligam às sondas de DNA na lâmina é chamado **hibridização**. Após a hibridização, o *microarray* é escaneado para medir a expressão de cada gene impresso na lâmina. Se a expressão de um gene em particular for maior na amostra teste do que na amostra controle, o ponto correspondente no *microarray* aparecerá **vermelho**. Por outro lado, se a expressão na amostra teste for menor que na amostra controle, o ponto aparecerá em **verde**. Porém, se houver expressão igual nas duas amostras, o ponto aparecerá **amarelo**.

Os dados coletados através de *microarrays* podem ser usados para criar **perfis de expressão gênica**, que mostram alterações simultâneas na expressão de muitos genes em resposta a uma condição ou tratamento específico.



Legenda: Técnica de *microarray* genômico.

Fonte: Figura adaptada de <https://microbenotes.com/dna-microarray/>.





(CESPE - INCA - 2010) Considerando as técnicas de biologia molecular aplicadas a métodos de diagnóstico, julgue o próximo item.

O uso da técnica de microarranjos de DNA permite detectar diferentes níveis de fosforilação de uma determinada proteína.

Certo

Errado

Comentários:

Um *microarray* (microarranjo) é uma ferramenta usada para detectar a **expressão de milhares de genes ao mesmo tempo**. Ela não detecta níveis de fosforilação.

Gabarito: Errado.

4 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica usada para **aumentar exponencialmente o número de cópias do DNA** de uma amostra (a partir de uma pequena amostra pode-se chegar a milhões ou bilhões de cópias). Esta técnica é realizada em um aparelho chamado **termociclador**, que, como o nome sugere, promove **alterações da temperatura em ciclos pré-definidos**.

Para se realizar a técnica de PCR, os seguintes elementos são necessários:

- Uma **amostra de DNA** que contenha a região alvo a ser amplificada;
- **DNA polimerase** termoestável: enzima responsável pela polimerização de novas fitas de DNA e que seja capaz de suportar altas temperaturas;
- Um **par de primers ou iniciadores** (*forward* e *reverse*): responsáveis pela especificidade da reação, devem ser complementares às extremidades 3' da região alvo de cada uma das fitas de DNA;
- **dNTPs** (desoxirribonucleotídeos): nucleotídeos que a DNA polimerase irá utilizar para sintetizar as novas fitas de DNA;
- **Solução tampão**: mantém as condições do ambiente favoráveis para a reação;
- **Cátions bivalentes**: geralmente magnésio e manganês.



A PCR pode ser dividida em 3 etapas:

- **Desnaturação** (94 a 96° C): nesta etapa ocorre a separação da dupla hélice.
- **Anelamento** (55 a 70°C): os *primers* (ou iniciadores) se ligam ao DNA alvo por complementariedade de bases.
- **Extensão** (72°C): a enzima Taq DNA polimerase sintetiza novas fitas de DNA.

Essas etapas se repetem várias vezes (20 a 40) de forma **cíclica**, e ao final do processo é possível obter milhões ou bilhões de cópias da sequência alvo. Todo o processo é concluído em algumas horas, sendo uma técnica relativamente **rápida**.

A PCR é empregada em análises genéticas voltadas para o diagnóstico de doenças genéticas, identificação de indivíduos (identificação criminal ou teste de paternidade), detecção de ácidos nucleicos de patógenos associados a doenças infecciosas, ou ainda na amplificação de material genético para ser utilizado em uma técnica que exija uma maior quantidade deste material.



Amostras de **sangue** destinadas à **PCR** devem ser coletadas em tubos contendo o anticoagulante **EDTA**.

Uma desvantagem da técnica de PCR é que, por ser muito sensível, caso haja **contaminação com DNA** que não seja da amostra, ele também pode ser amplificado, levando a resultados **falsos-positivos**.

Por este motivo, a adição de todos os reagentes e da amostra deve ser feita em uma "**área livre de DNA**". Os **amplicons** (**produtos finais da reação de PCR**) não devem retornar às áreas do laboratório onde as etapas anteriores foram realizadas.

Uma outra medida para prevenir a contaminação da amostra é a utilização de **ponteiras com barreira** para pipetar as amostras e reagentes.



HORA DE
PRATICAR!



(CESPE - INCA - 2010) No que se refere aos aspectos relacionados aos grupos de biomoléculas abordados em análises clínicas, julgue o item subsequente.

A formação de novos ácidos nucleicos, em processos como a técnica de PCR, envolve a formação de novas ligações fosfodiéster.

Certo

Errado

Comentários:

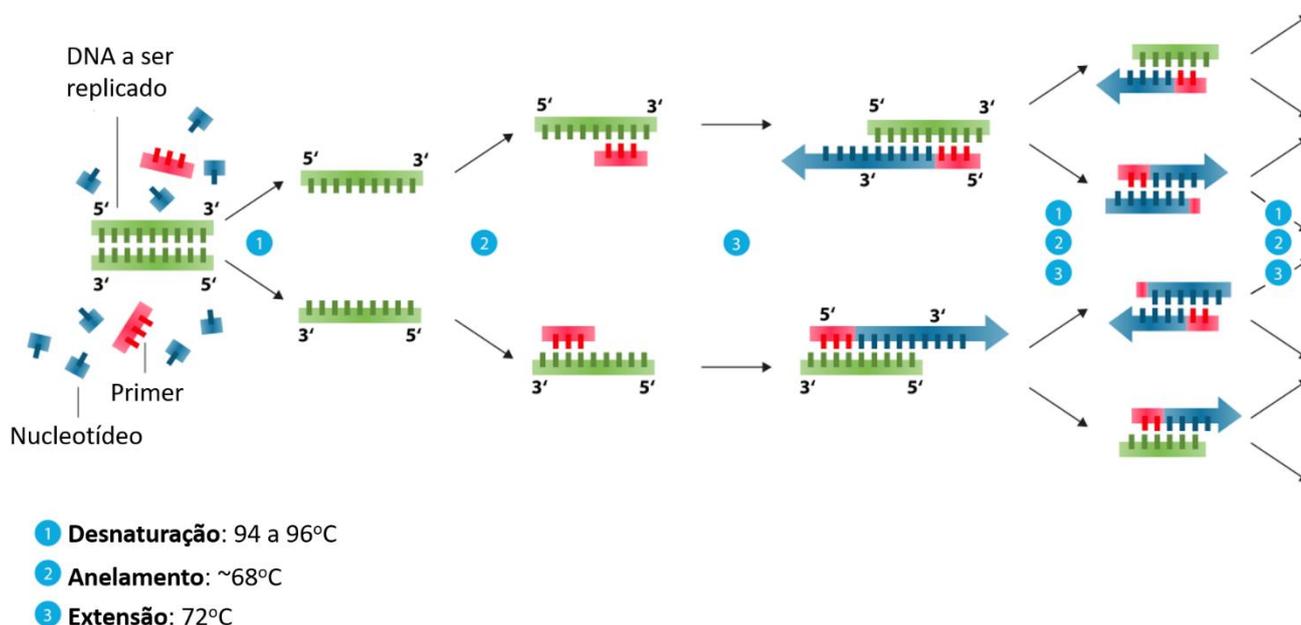
As ligações fosfodiéster são as que ligam um nucleotídeo a outro. Como a PCR envolve a síntese de novas fitas de DNA, são formadas novas ligações fosfodiéster.

Gabarito: Certo.

4.1 – PCR convencional

A PCR convencional foi a primeira técnica de PCR a ser desenvolvida, servindo de base para todas as outras que a sucederam. Uma importante característica da técnica de PCR convencional é que ela é **qualitativa**.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)



Legenda: Desenho esquemático do ciclo de PCR.

Fonte: Figura adaptada de

https://pt.wikipedia.org/wiki/Rea%C3%A7%C3%A3o_em_cadeia_da_polimerase#/media/Ficheiro:Polymerase_chain_reaction.svg



4.2 – PCR em tempo real (quantitativa)

A **PCR quantitativa (qPCR)**, que também é chamada de **PCR em tempo real**, é uma extensão da técnica original (PCR convencional). O objetivo da qPCR é medir exatamente quanto do DNA está sendo produzido ao longo do tempo. Isso permite **determinar a quantidade exata de DNA** em uma amostra.

A qPCR funciona de maneira semelhante à PCR convencional, no entanto, para rastrear a quantidade de DNA produzido, deve-se adicionar algum tipo de **sonda** à mistura antes que a reação ocorra. Essas sondas, também chamadas de oligonucleotídeos, são marcadas com uma molécula **fluorescente** que é liberada da sonda quando a fita de DNA é totalmente copiada.

À medida que milhões de fitas de DNA são sintetizadas, essas moléculas começam a emitir uma forte resposta fluorescente, que pode ser capturada diretamente por uma câmera óptica na máquina qPCR. A amplitude dessa resposta pode então ser plotada em um gráfico, onde **a fluorescência é diretamente proporcional à concentração de DNA amplificado**.



(CESPE - HEMOBRÁS - 2008) Considerando os métodos sorológicos atualmente empregados no diagnóstico de doenças transmitidas pelo sangue, julgue os itens que se seguem.

Os testes para detecção do HIV podem ser realizados com o uso da técnica de PCR em tempo real, a qual detecta a presença de anticorpos contra o vírus.

Certo

Errado

Comentários:

A técnica de PCR em tempo real pode ser usada para detecção do vírus HIV, mas ela não detecta **anticorpos**, e sim o **material genético** do vírus.

Gabarito: Errado.

4.3 – PCR *nested*

A **PCR *nested*** (que em português significa "**aninhada**") é outra variação da técnica de PCR, que visa reduzir os erros que são cometidos durante a amplificação do DNA. Alguns *primers* usados na PCR



convencional tendem a se ligar a sítios não específicos do DNA, o que dilui a quantidade de DNA utilizável na amostra.

Para resolver esse problema, a PCR *nested* utiliza **dois pares de primers**. O primeiro par visa amplificar um fragmento de DNA mais longo do que o necessário e é direcionado para fora da região de DNA alvo. O segundo par é então ligado, ou "aninhado" dentro da região de DNA alvo, e apenas transcreve a área de interesse do primeiro produto de PCR. O uso de pares duplos **reduz bastante a probabilidade de que qualquer produto inespecífico seja amplificado**, basicamente servindo como uma espécie de "verificação dupla" para o processo.

4.4 – PCR multiplex

Uma terceira variação da técnica de PCR é conhecida como **PCR multiplex**, e é uma alternativa para **amplificar várias sequências de DNA diferentes na mesma amostra**, o que seria muito demorado e dispendioso para ser concluído com várias PCR convencionais.

Resumidamente, a técnica é realizada **usando-se vários primers ao mesmo tempo**. No entanto, deve-se tomar cuidado para garantir que haja sobreposição mínima entre as especificidades dos *primers*, pois a ligação inespecífica pode significar o insucesso do processo.



SeptiFast

O SeptiFast é uma técnica de PCR multiplex que permite a detecção de **25 patógenos comuns do sangue**, possuindo a vantagem de ser uma técnica consideravelmente mais rápida que uma hemocultura convencional. Por este motivo, é um método empregado para diagnóstico de infecções da corrente sanguínea.

4.5 – PCR com transcrição reversa

A **PCR com transcrição reversa (RT-PCR)**, do inglês *reverse transcription PCR* começa com uma **amostra de RNA** e realiza um processo inverso à transcrição, produzindo uma molécula de **DNA complementar (cDNA)** através do uso de uma enzima conhecida como **transcriptase reversa**. Esse cDNA pode então ser amplificado por uma metodologia semelhante ao processo de PCR convencional.



A RT-PCR é amplamente utilizada no diagnóstico de **doenças virais**, pois alguns vírus (como o HIV) possuem RNA como material genético.

A sigla RT-PCR é muitas vezes confundida com PCR em tempo real (*real time PCR*), mas o uso correto desta sigla é como abreviação da técnica de PCR com transcrição reversa.

4.6 – PCR RFLP

A **PCR RFLP** (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) é uma técnica que utiliza **enzimas de restrição** para clivar sítios específicos no DNA alvo (após amplificação por PCR) e assim detectar a presença de polimorfismos nos fragmentos com diferentes comprimentos. A PCR RFLP é geralmente seguida pela técnica de eletroforese, que permite visualizar e analisar os fragmentos de tamanhos diferentes.

5 - Eletroforese

A **eletroforese** é um método de **separação de moléculas por um campo elétrico** através de uma matriz (**gel de agarose ou poliacrilamida**). Esta técnica pode ser usada para separar proteínas e ácidos nucleicos (DNA ou RNA), de acordo com sua carga e peso molecular.

Uma eletroforese de DNA é comumente realizada após uma PCR, para visualizar o material genético amplificado em forma de "**bandas**". Fragmentos de DNA mais curtos migram mais rapidamente, enquanto os fragmentos mais longos permanecem mais próximos à origem do gel, resultando em separação com base no tamanho. Dessa forma, além de poder detectar a **presença ou ausência** do DNA, também é possível determinar o tamanho do fragmento, ao utilizar um padrão de peso molecular.



Legenda: Eletroforese de DNA.

Fonte: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-electrophoresis.html>



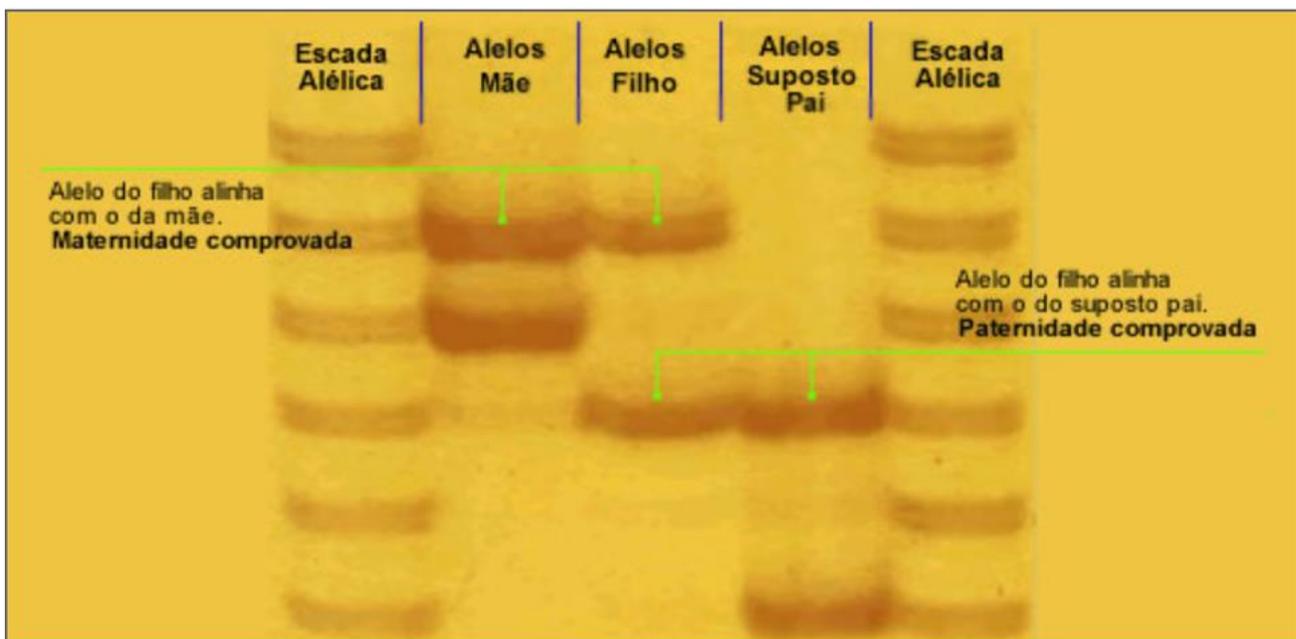
6 - Teste de Paternidade

O **exame genético** para **determinação da paternidade** é um teste extremamente confiável, atingindo **99,9% de acurácia** nos seus resultados, e que permite excluir ou confirmar com alta precisão a paternidade biológica de alguém pela **análise comparativa do DNA** do **filho** com o do **suposto pai**.

No genoma humano existem regiões do DNA que são compostas por **sequências repetitivas altamente polimórficas**, ou seja, sequências que são **muito variáveis entre indivíduos diferentes**, sendo assim altamente improvável que duas pessoas que não possuam parentesco apresentem o mesmo genótipo nessas regiões. O exame de paternidade se baseia na análise de diversas regiões polimórficas repetitivas espelhadas pelo genoma a fim de determinar a **compatibilidade dos alelos entre o filho e o suposto pai**. Sabendo-se que todos os indivíduos herdam **50% do DNA da mãe e 50% do DNA do pai**, os alelos que não forem maternos são necessariamente paternos. Assim, quando há compatibilidade de alelos, pode-se afirmar com pelo menos 99,9999% de certeza que existe uma relação de paternidade e, da mesma forma, quando os alelos não são compatíveis, pode-se excluir a paternidade com o mesmo nível de certeza.

O método de biologia molecular utilizado para os testes de paternidade é a **PCR**, que permite amplificar os fragmentos a serem analisados. Ao final da técnica, as amostras são aplicadas em um **gel** para **eletroforese** e a análise é realizada através da **comparação das bandas**. Como veremos no exemplo a seguir.

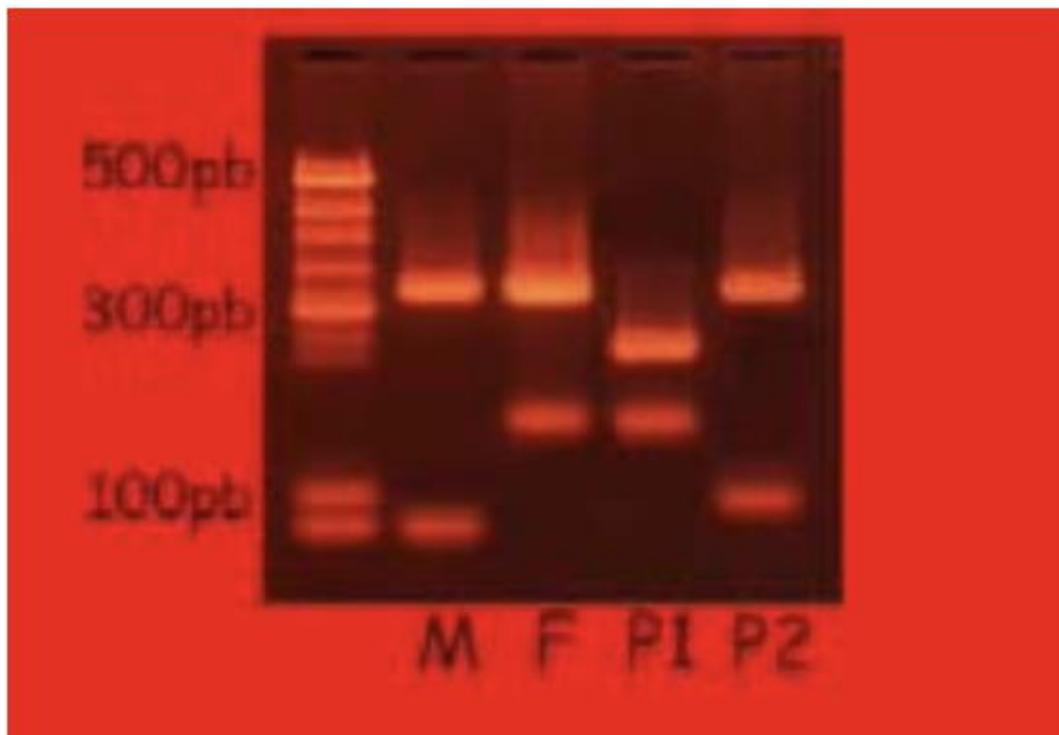
A figura abaixo mostra um resultado no gel de eletroforese. A **posição das bandas** é correspondente ao **tamanho da sequência de DNA** analisada. Como as sequências avaliadas são repetitivas, a **variabilidade está no tamanho das repetições**. Assim, os alelos são compatíveis se estiverem na mesma "altura" no gel, ou seja, se apresentarem o mesmo tamanho.



Fonte: <https://www.citocamp.com.br/paternidade/pcr.html>

Sabemos que um dos alelos do filho é de origem materna e o outro é de origem paterna. Na figura acima podemos ver que a **segunda coluna** mostra os **alelos maternos**, a **terceira coluna** os **alelos do filho** e a **quarta coluna** os **alelos do suposto pai**. A banda superior do filho (o primeiro alelo) é compatível com a banda superior da mãe, ou seja, estão na mesma altura no gel, ou em outras palavras, os fragmentos de DNA apresentam o mesmo tamanho. Assim, se sabemos que a primeira banda do filho veio da mãe, a segunda banda, a mais inferior tem que ser igual a um dos alelos do pai. Na figura, podemos observar que a banda mais inferior (**o segundo alelo**) do filho **combina com a banda mais superior do suposto pai**, portanto, podemos **afirmar a paternidade**.

Vamos ver abaixo um outro exemplo:



Fonte: <http://sites.ffclrp.usp.br/laife/teia/Arquivos/Apostilas/10%20-%2008-10-05/Turma%20I/Paternidade/Apostila%20-%20Paternidade.pdf>

A figura acima mostra um outro exemplo de teste de paternidade, mas dessa vez temos **dois supostos pais** representados nas **colunas P1 e P2**. Começamos a análise, então, vendo qual dos alelos do filho veio da mãe. Ao observarmos o gel, fica fácil afirmar que a banda superior do filho é compatível com a banda superior da mãe, portanto, a banda inferior (o segundo alelo) tem que ser obrigatoriamente compatível com um alelo paterno. Dentre os dois supostos pais, vemos que apenas o **P1 apresenta uma banda na mesma altura que a banda inferior do filho** e, portanto, ele é o **pai biológico**. É importante observar que o P2, também apresenta uma banda na mesma altura que a do filho, só que já sabemos que esse alelo específico foi herdado da mãe, portanto, **P2 não é o pai biológico** e temos um caso de **exclusão da paternidade**.

Além da análise em gel, atualmente a **PCR em tempo real** permite a análise com **marcadores de fluorescência**. Nesse método, a intensidade do sinal corresponde à quantidade de material amplificado.



Os **testes de paternidade** podem ser realizados ainda no **pré-natal**, através da coleta de materiais que tenham **DNA do feto**, como **líquido amniótico** ou **vilo corial**. As amostras de vilo podem ser coletadas a partir da 10ª semana de gestação através de uma aspiração de células da placenta. Já a coleta de líquido amniótico pode ser feita a partir da 14ª semana de gravidez.

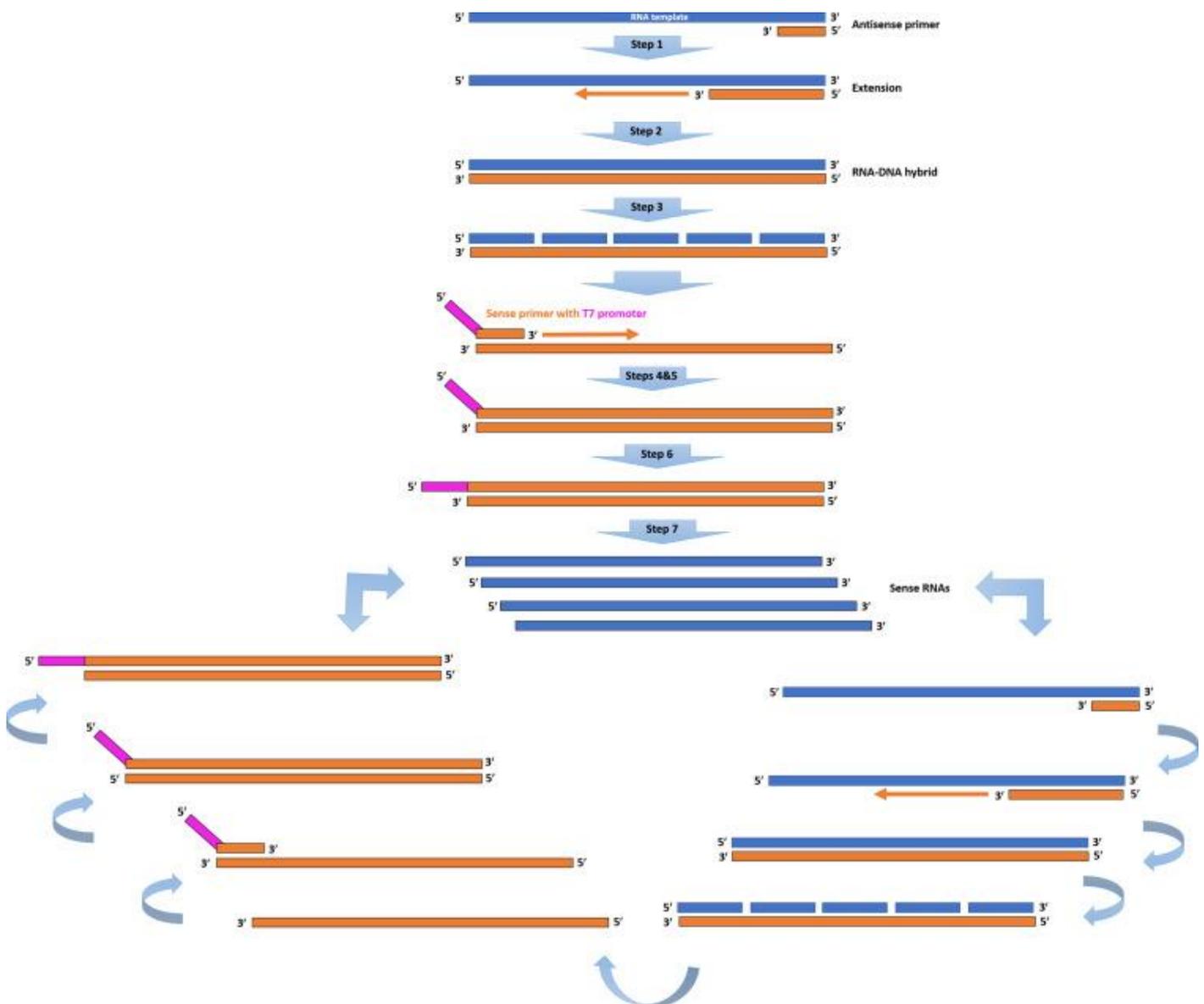
7 - NASBA/TMA

A amplificação baseada na transcrição inclui **amplificação mediada pela transcrição** (*transcription-mediated amplification* - **TMA**) e **amplificação baseada na sequência de ácido nucleico** (*nucleic acid sequence-based amplification* - **NASBA**). Ambas são reações de **amplificação isotérmica** que mimetizam a replicação do **RNA retroviral**. Ambos são específicos para sequências de RNA alvo e têm ganhado popularidade porque demonstraram ter uma ampla gama de aplicações para detecção de patógenos em amostras clínicas, ambientais e de alimentos.

Como alternativa à RT-PCR para amplificação de RNA, NASBA e TMA têm a vantagem de **não exigir ciclos de variação de temperatura**. Essas duas técnicas usam a função de uma **RNA polimerase** para sintetizar RNA a partir de um **promotor** desenvolvido na região do *primer*, e uma **transcriptase reversa**, para produzir DNA a partir dos moldes de RNA.

Na **TMA**, a própria transcriptase reversa degrada o molde de RNA inicial à medida que sintetiza seu **DNA complementar (cDNA)**. Na **NASBA**, esta tecnologia de amplificação de RNA conta ainda com a uma terceira atividade enzimática, **RNase H**, para remover o RNA do cDNA sem a etapa de desnaturação por calor. Durante a reação, o *primer forward* hibridiza com qualquer RNA alvo presente na amostra. As enzimas transcriptase reversa e RNase H, juntamente com o *primer reverse*, então, produzem um **DNA de fita dupla** (*double-stranded DNA* - **dsDNA**) com a sequência alvo e um **promotor T7** (uma sequência promotora que pode ser reconhecida pela RNA polimerase T7). A RNA polimerase T7 dependente de DNA usa este dsDNA para produzir muitas fitas de RNA complementares ao RNA alvo original. Após esta fase inicial da NASBA, cada RNA recém-sintetizado pode ser copiado em uma fase cíclica, resultando em uma amplificação exponencial do RNA complementar ao alvo. Assim, a etapa de termociclagem é eliminada, gerando um método de **amplificação isotérmica** denominado "**replicação de sequência autossustentada**". Os produtos finais de NASBA e TMA podem ser detectados usando eletroforese em gel, sondas fluorescentes e ensaio colorimétrico.





Legenda: Mecanismo de amplificação baseada na sequência de ácido nucleico (NASBA).
Fonte: SHEN, Chang-Hui. *Diagnostic molecular biology*. Academic Press, 2019.

8 - bDNA

O ensaio de "**DNA ramificado**" (*branched DNA - bDNA*) fornece uma ferramenta única e poderosa para quantificação confiável de moléculas de ácido nucleico. Esta técnica difere dos métodos de amplificação de alvo, como a PCR, porque o ensaio de bDNA **mede diretamente as moléculas de ácido nucleico em níveis fisiológicos**, aumentando o sinal de uma "**molécula reporter**", em vez de replicar as sequências alvo como forma de detecção, e, portanto, evita os erros inerentes à extração e amplificação de sequências alvo.

O ensaio de bDNA emprega **amplificação de sinal linear** usando sondas de oligonucleotídeos sintéticos e moléculas de bDNA, e pode medir com acurácia e precisão entre aproximadamente 500 e 10.000.000 de moléculas.

O ensaio de bDNA usa um formato de **microplaca** de 96 poços e é baseado em uma série de reações de **hibridização** específicas e detecção **quimioluminescente** de sondas hibridizadas. Ligadas à superfície de cada micropoço estão "**sondas de captura**" que contêm uma sequência de nucleotídeos específica. Estas sondas de captura se ligam a um subconjunto de "**sondas alvo**" que são ligadas a sequências de nucleotídeos específicas na molécula de ácido nucleico alvo. Esta série de hibridizações ancora a molécula de ácido nucleico alvo à superfície do micropoço. A detecção do ácido nucleico alvo e a amplificação do sinal são realizadas por meio de outra série de hibridizações.

Um segundo subconjunto de sondas alvo liga a molécula de ácido nucleico alvo a **moléculas amplificadoras de bDNA**. A adição de moléculas de **pré-amplificador** fornece um aprimoramento adicional, e uma amplificação de sinal ainda maior pode ser obtida. Cada molécula amplificadora de bDNA é projetada para conter 15 braços, cada um dos quais contém três sítios de ligação para "**sondas de marcação**" conjugadas com **fosfatase alcalina**. Um sinal **quimioluminescente** é gerado após a introdução de um substrato de **dioxetano** que é ativado pela fosfatase alcalina. Este sinal pode ser quantificado pela contagem do número de fótons emitidos em um **luminômetro**. O ensaio de bDNA é inerentemente **quantitativo**, uma vez que o número de fótons emitidos está diretamente relacionado à quantidade de ácido nucleico alvo na amostra.

9 - Teste de ácido nucleico (NAT)

O **teste de ácido nucleico (NAT)** é um sistema capaz detectar a presença de **microrganismos** (como o vírus da imunodeficiência humana - **HIV** - e o vírus da hepatite C - **HCV**) em amostras de **sangue** e **hemoderivados**, permitindo a detecção precoce de infecções em doadores e conferindo maior segurança aos procedimentos hemoterápicos.

O sistema NAT apresenta **maior sensibilidade** diagnóstica em comparação aos testes sorológicos, porque detecta material genético em vez de antígenos ou anticorpos. A detecção de material genético, realizada principalmente por **PCR em tempo real**, permite a **detecção precoce na infecção**, uma vez que o surgimento de anticorpos requer tempo para que o doador desenvolva uma resposta imune, e a detecção de antígenos requer tempo para que um nível mais alto dos organismos seja detectável na corrente sanguínea.

Esta tecnologia detecta quantidades muito pequenas de material genético, copiando-o várias vezes, resultando na **amplificação** do material alvo. Por exemplo, o NAT pode detectar os RNAs de **HIV-1** e **HCV** em **pools** de amostras obtidas de **vários doadores** simultaneamente. Também é possível testar amostras de doadores individuais. Se a testagem de um *pool* for positiva para qualquer um dos vírus, as amostras incluídas deste *pool* devem ser testadas individualmente para identificar qual(is) está(ão) infectada(s) e evitar a contaminação dos receptores.



A realização do teste NAT envolve as seguintes etapas:

1. Preparação das amostras de sangue e *pooling*;
2. Extração do ácido nucleico viral e sua purificação ou captura;
3. Amplificação do RNA ou do DNA alvo e detecção do produto amplificado.



Quais a vantagem do NAT sobre os testes sorológicos?

Os doadores de sangue e hemoderivados são submetidos a testes sorológicos (para detecção de antígenos e/ou anticorpos) rotineiramente, visando a triagem de infecções como as causadas pelo HCV e HIV. No entanto, existe um período chamado de **janela imunológica**, durante o qual um doador pode já estar infectado, mas ainda assim apresentar resultados negativos nesses testes de triagem.

Isso acontece porque demora um tempo até que o sistema imunológico humano comece sua reação contra um patógeno invasor. Durante esse período, um microrganismo pode estar se espalhando no sangue sem ser detectável pelos testes sorológicos convencionais. Como estas amostras podem infectar receptores de transfusão de sangue e hemoderivados, o teste NAT tornou-se uma técnica importante para **reduzir o período de janela imunológica**.

Com o uso do NAT para HCV, o período de janela imunológica é reduzido de aproximadamente 57 dias para apenas 7 dias. Já para o HIV-1, o período médio de janela imunológica com testes sorológicos é de 22 dias. Este período é reduzido para cerca de 10 dias com o NAT.

É importante ressaltar que o teste NAT não visa substituir os testes sorológicos, mas sim **complementá-los**, uma vez que, com a evolução da infecção, a carga viral pode se tornar muito baixa e não ser detectada pelo NAT. Lembre-se de que **nenhum teste é 100% sensível ou específico**.



Considerações Finais

Chegamos ao final da aula de biologia molecular. Como vocês podem perceber, os conteúdos são muito extensos e relacionados entre si. As técnicas de biologia molecular têm diversas aplicações práticas, e é preciso ter um bom entendimento das bases genéticas para entender todos esses procedimentos e suas aplicações.

Se tiverem alguma dúvida, estou disponível no fórum de dúvidas e no meu Instagram.

Ana Cristina Lopes

Instagram: <https://www.instagram.com/prof.anacristinalopes/>



LISTA DE QUESTÕES



HORA DE
PRATICAR!

1. (UFG - 2018) A hibridização é uma técnica para a identificação de moléculas específicas de DNA e RNA por meio do uso de sondas. Nesse aspecto, o princípio da hibridização é empregado em análises por microarranjos (*microarray*), que é uma técnica constituída

A) pela ligação de centenas a milhares de seqüências de DNA desconhecidas a uma superfície sólida, como uma placa de plástico ou lâmina, por exemplo.

B) pela hibridização das seqüências "alvo" ao arranjo de sondas de DNA, gerando uma intensidade de sinal a cada espécie de DNA no arranjo, correspondente ao nível de expressão do gene em questão.

C) por seqüências de DNA fixas não marcadas, chamadas de "alvo", porque são seqüências conhecidas, enquanto as seqüências "sonda" são compostas de c-DNAs marcados e amplificados, a partir de um RNA total de uma célula ou tecido.

D) pela quantidade de mRNA em uma amostra, em vez do seu tamanho, conforme o princípio da técnica de hibridização de *Southern blot*. Nesse caso, a quantidade de hibridização reflete o nível de expressão do gene que codifica o mRNA em questão.

2. (UFTM - 2019) Assinale a opção que contém o conjunto de palavras que melhor completa a frase abaixo:

A hibridização *in situ* é uma técnica ideal para: (1) determinar se uma célula tem uma seqüência específica de DNA (como um _____ ou parte dele), (2) identificar células contendo mRNAs específicos (o qual corresponde a um gene sendo _____) e (3) determinar a localização de um gene (em um _____ específico).

A) gene/hibridizado/núcleo.

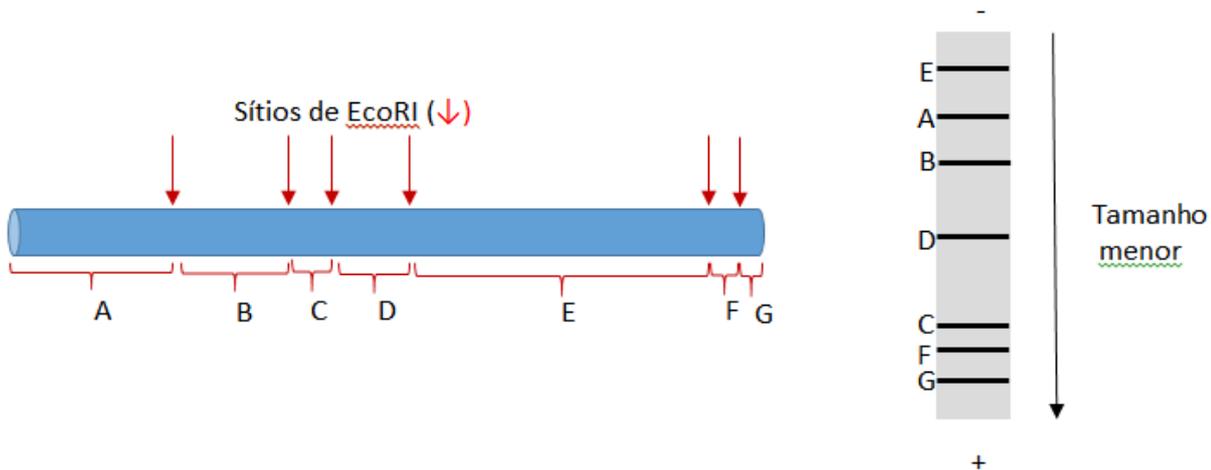
B) exon/transportado/cromossomo.

C) gene/transcrito/cromossomo.

D) intron/silenciado/ribossomo.



3. (UFG - 2018) Para realizar a análise dos ácidos nucleicos ou o estudo de genomas, são utilizadas várias técnicas de biologia molecular. O polimorfismo por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição, é uma dessas técnicas e utiliza enzimas de restrição que clivam o DNA em pontos específicos, gerando fragmentos de diferentes tamanhos que são separados e visualizados em forma de bandas. A figura a seguir representa uma digestão de um fragmento de DNA com a endonuclease Eco RI.



WATSON, J.D. et al. *Biologia molecular do gene*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. (Adaptado).

Considerando a figura apresentada, a enzima de restrição EcoRI possui

- A) sete sítios de restrição, e clivou o fragmento de DNA em sete fragmentos de tamanhos diferentes, o menor deles representado pela letra A.
- B) sete sítios de restrição, e clivou o fragmento de DNA em sete fragmentos de tamanhos diferentes, o maior deles representado pela letra E.
- C) seis sítios de restrição, e clivou o fragmento de DNA em sete fragmentos de tamanhos diferentes, o maior deles representado pela letra E.
- D) seis sítios de restrição, e clivou o fragmento de DNA em sete fragmentos de tamanhos diferentes, o maior deles representado pela letra A.

4. (AOCP - SUSIPE-PA - 2018) A utilização de técnicas laboratoriais de biologia molecular é primordial para o diagnóstico de determinadas doenças. As principais técnicas utilizam certas enzimas para que a análise do DNA seja possibilitada. Dentre essas técnicas, uma das mais conhecidas é a PCR. Sobre a PCR, assinale a alternativa que apresenta a enzima base para a realização dos seus procedimentos.

- A) Transcriptase reversa.
- B) DNA coloidase.



- C) DNA polimerase.
- D) DNA sintetase.
- E) Transcriptase lisosterase.

5. (COMPERVE/UFRN - Pref. Natal/RN - 2018) Os plasmídeos são pequenos segmentos de DNA circular com replicação independente, presentes em bactérias, e proporcionam a transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos entre bactérias de diferentes gêneros através da conjugação. Alguns plasmídeos são identificados e classificados por sequenciamento completo de DNA. Para sequenciar um plasmídeo, faz-se necessária uma grande quantidade de cópias desse DNA. A técnica adequada para a clonagem e amplificação desse DNA é

- A) o sequenciamento automatizado.
- B) a eletroforese de DNA em gel.
- C) o *southern blotting* em nitrocellulose.
- D) a reação em cadeia da polimerase.

6. (IBFC - SESACRE - 2019) Técnica baseada na amplificação enzimática de um fragmento de DNA através de repetidos ciclos com variação de temperatura, resultando num acúmulo exponencial de um fragmento específico. Sobre o nome da técnica de biologia molecular descrita, assinale a alternativa correta.

- A) *Southern blotting*
- B) Eletroforese em campo pulsátil
- C) Reação em cadeia da polimerase
- D) *Western blotting*

7. (IBFC - SESACRE - 2019) É consenso que a PCR (*Polymerase Chain Reaction*; reação em cadeia de polimerase) é uma das técnicas que mais revolucionou a medicina nos últimos tempos, tornando a medicina molecular um verdadeiro ramo da clínica médica. Com relação à Técnica de PCR, analise as afirmativas abaixo e assinale a alternativa correta.

- A) A PCR não permite que o ácido nucléico-alvo seja especificamente selecionado
- B) A amplificação do *primer* não é exponencial



- C) Sua técnica, apesar de revolucionária, possui um tempo de reação longo, em sua maioria cerca de 20 horas
- D) Amplifica por milhares de vezes o alvo selecionado

8. (UFMT - Pref. Várzea Grande/MT - 2018) O diagnóstico laboratorial de várias doenças infecciosas pode ser realizado por meio de técnicas moleculares.

Para algumas doenças virais, a determinação da Carga Viral é imprescindível para o acompanhamento e tratamento do paciente. Qual técnica molecular é utilizada para a determinação da carga viral?

- A) Nested PCR
- B) PCR RFLP
- C) *Real Time* PCR
- D) PCR Convencional

9. (UFG - 2018) A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que foi aperfeiçoada ao longo de décadas, tornando possível a amplificação seletiva de sequências de DNA de pacientes. É utilizada como um instrumento de análise de rotina nos laboratórios de diagnósticos e pesquisa. O princípio dessa técnica é

- A) amplificar regiões específicas do genoma ou de transcritos por meio de repetições das etapas de desnaturação, anelamento e polimerização, em média de 20 a 30 ciclos. A etapa de polimerização é realizada pela adição de enzima DNA polimerase após cada ciclo de desnaturação.
- B) amplificar segmentos previamente definidos da molécula de DNA, sendo necessária a síntese de iniciadores específicos que amplificam o fragmento desejado a cada ciclo, que compreende três etapas: desnaturação, hibridização e extensão.
- C) possibilitar, em tempo real (qPCR), o acompanhamento da amplificação do DNA em todo o processo e não somente no final. Para que isso ocorra, as etapas obedecem à seguinte ordem: desnaturação, anelamento, polimerização e transcrição reversa.
- D) permitir a hibridização *in situ* por fluorescência, cujas etapas ocorrem na seguinte ordem: desnaturação, anelamento ou hibridização, extensão ou polimerização.

10. (Quadrix - SEDF - 2018 - adaptada) No que concerne às técnicas de engenharia genética, julgue os itens que se seguem.



I. O uso de PCR e *primers*, que atuam como sondas, por complementaridade específica ao DNA do microrganismo-alvo, permite identificar a presença de patógenos em amostras biológicas, mesmo que estejam em baixa quantidade.

II. Na PCR, utiliza-se uma DNA-polimerase capaz de produzir várias cópias de moléculas de fita dupla de DNA. Essa técnica envolve a repetição de um ciclo com três etapas: desnaturação; anelamento; e extensão.

- A) As duas afirmativas estão corretas.
- B) A afirmativa I está correta e a afirmativa II está errada.
- C) A afirmativa II está correta e a afirmativa I está errada.
- D) As duas afirmativas estão erradas.

11.(CESGRANRIO - UNIRIO - 2019) Para o diagnóstico molecular de doenças virais, depara-se tanto com vírus cujo material genético é constituído de DNA, quanto com vírus constituído de RNA.

Para o diagnóstico de viroses causadas por vírus do tipo RNA, que tipo de método molecular deve ser utilizado?

- A) RT-PCR
- B) IFI
- C) PCR
- D) Nested PCR
- E) Hibridação *in situ*

12.(UFTM - 2019) A PCR (reação em cadeia da polimerase) requer todos os componentes seguintes, EXCETO:

- A) Iniciadores.
- B) DNA ligase.
- C) DNA polimerase.
- D) Desoxirribonucleotídeos.

13.(UFTM - 2019) Em relação a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), todas as alternativas estão corretas, EXCETO:



- A) Quando se deseja amplificar RNA por PCR, a molécula deve inicialmente ser convertida em cDNA complementar, pela enzima transcriptase reversa.
- B) A PCR convencional permite a obtenção de dados quantitativos sobre as sequências pesquisadas.
- C) Uma das limitações técnicas do PCR para diagnóstico é a facilidade de contaminação do equipamento podendo levar a resultados falsos-positivos.
- D) O resultado da técnica de PCR em tempo real é dado em escala exponencial.

14.(UFTM - 2019) Em relação a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), a primeira etapa do procedimento é:

- A) Amplificação.
- B) Dissociação.
- C) Desnaturação.
- D) Anelamento.

15.(UFTM - 2019) As sondas utilizadas na hibridização *in situ* precisam estar ligadas a um marcador que permita a posterior visualização e localização no interior de uma célula ou tecido. São exemplos de marcadores usados na hibridização *in situ*, EXCETO:

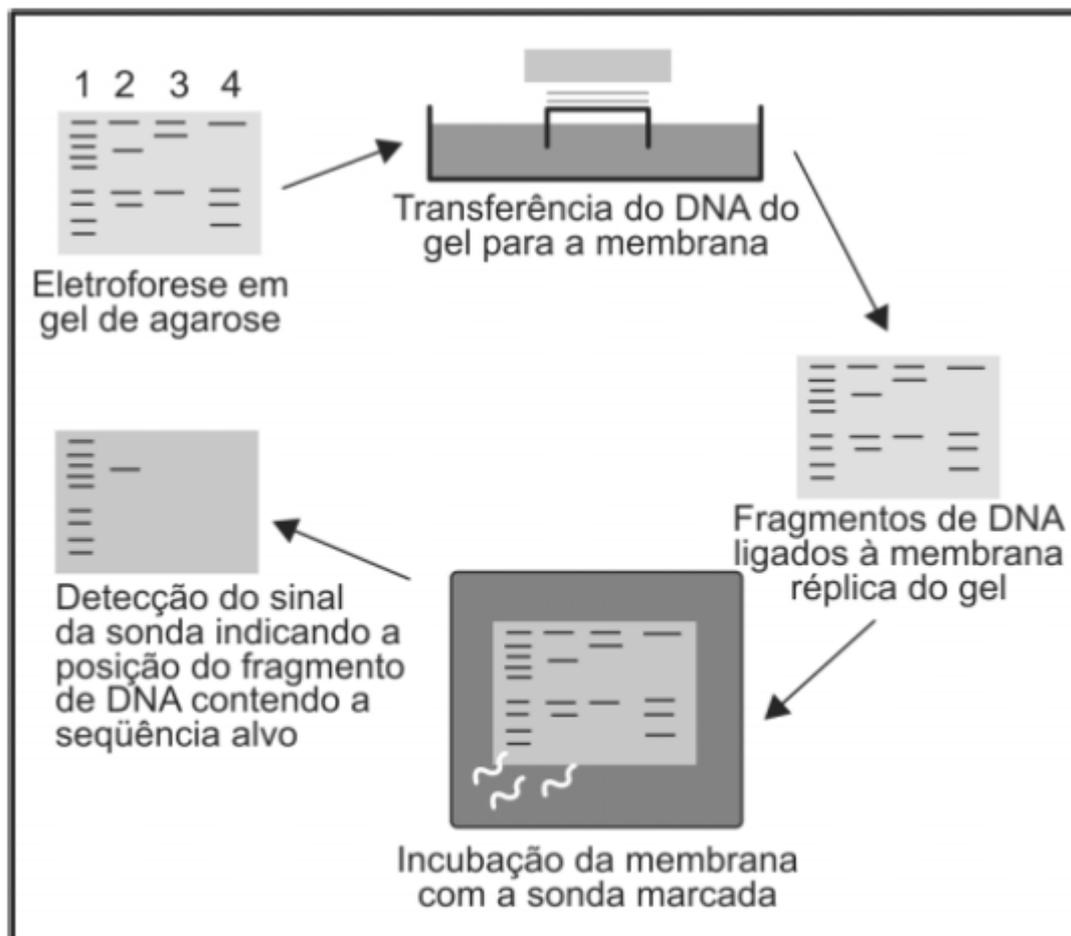
- A) radioisótopo ³⁵ do enxofre.
- B) radioisótopo ¹³⁷ do céσιο.
- C) digoxigenina.
- D) radioisótopo ³³ do fósforo.

16.(UFTM - 2019) Hibridização *in situ* é uma técnica que permite a detecção de ácidos nucleicos em células e tecidos, preservando a sua morfologia. Para esse fim são usadas sondas de cadeias simples de RNA ou DNA que devem apresentar a seguinte característica em relação à sequência alvo:

- A) A sonda deve ser isomérica em relação à cadeia alvo.
- B) A sonda deve reconhecer epítomos da cadeia alvo.
- C) A sonda deve ser idêntica em relação à cadeia alvo.
- D) A sonda deve ser complementar em relação à cadeia alvo.



17.(FCC - Prefeitura de Macapá - AP - 2018) Considere a figura abaixo.



Legenda: Na eletroforese, 1 corresponde ao padrão de DNA de tamanho conhecido, 2, 3 e 4 são amostras de DNA a serem analisadas.

Macedo *et al.* Técnicas de Biologia Molecular e Clonagem. Ed. Educacional, 2012.

As etapas apresentadas na figura correspondem à técnica de

- A) Southern blotting.
- B) Western blotting.
- C) PCR.
- D) ELISA indireto.
- E) Pareamento indireto de DNA.

18.(FCC - Prefeitura de Macapá - AP - 2018) Considere o trecho abaixo retirado de um artigo científico.

As proteínas de *T. gondii* a serem usadas no IgG-WB foram quantificadas com o método de Lowry *et al.* e o gel de poliacrilamida 12% foi usado na separação eletroforética de proteínas com a transferência subsequente das proteínas para uma membrana de nitrocelulose. O papel de nitrocelulose foi manchado com Ponceau e, após lavagem com água destilada, as tiras de nitrocelulose foram cortadas e bloqueadas com leite desnatado a 5% mais Tween® salina tamponada com Tris (TBS). Posteriormente, lavou-se as tiras com TBS e leite desnatado a 5% e, então, adicionou-se o soro do paciente diluído em Tween TBS e leite desnatado a 5%, lavou-se e adicionou-se conjugado IgG anti-humano diluído em Tween TBS e leite desnatado a 5%. Após lavagens adicionais, o substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB) a 0,2% e peróxido de hidrogênio (100 µL) foi adicionado. Quando as bandas foram visualizadas, a reação foi interrompida com água destilada. As amostras de controle positivo e negativo de anti-*T. gondii* foram incluídas em cada teste.

(Adaptado de Capobianco, J.D. *et al.*, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br>)

A técnica utilizada foi a de

- A) PCR.
- B) Northern blotting.
- C) ELISA.
- D) Western blotting.
- E) Citometria de fluxo.

19. (FCC - Prefeitura de Macapá - AP - 2018) Atualmente não se pode mais falar em diagnóstico rápido e preciso sem o uso de técnicas moleculares de diagnóstico. Considere, como exemplo, o diagnóstico do HPV (Papiloma Vírus Humano), que possui DNA circular, apresenta mais de 100 genótipos, dos quais grande parte está relacionada a processos malignos e lesões precursoras em cérvix uterinas. Dentre estas técnicas, a PCR detecta e identifica o material genômico dos HPVs, o que permite saber se o vírus é de alto ou baixo risco oncogênico. Sobre essa técnica é correto afirmar:

- A) Dentre as etapas básicas da técnica estão a desnaturação com resfriamento da amostra, seguida do aquecimento para o anelamento e depois o resfriamento novamente para a síntese de novas fitas.
- B) Atualmente existem várias modificações da técnica de PCR convencional, sendo as principais a PCR em Tempo Real ou Q-PCR (PCR quantitativa) e RT-PCR (PCR por Transcrição Reversa, para se amplificar amostras de DNA).
- C) Os produtos amplificados por PCR podem ser clivados com enzimas de restrição e os fragmentos obtidos são comparados para identificação do subtipo viral, o que permite classificar seu grau de risco.



- D) Para identificação dos subtipos de HPV é utilizada uma mesma sequência iniciadora (*primer*).
- E) Uma reação de PCR convencional utiliza DNase, DNA molde, nucleotídeos e polimerase.

20.(FCC - Prefeitura de Macapá - AP - 2018) Uma importante técnica de biologia molecular, por meio de etapas de variação de temperatura, possibilita a duplicação de cadeias de DNA *in vitro*, através do emprego dos quatro nucleotídeos (dNTP's) do DNA, sequências iniciadoras (*primers*) e uma DNA polimerase termoestável. Esta técnica é denominada

- A) *Western Blotting*.
- B) PCR.
- C) ELISA.
- D) *Southern Blotting*.
- E) Imuno-histoquímica.

21.(CS-UFG - 2017) A identificação e quantificação de moléculas específicas em células e tecidos pode ser realizada pela interação antígeno-anticorpo. Quais metodologias utilizam dessa interação para identificação molecular?

- A) *Northern Blot* e qRT-PCR.
- B) *Western Blot* e citometria de fluxo.
- C) *Southern Blot* e espectrometria de massa.
- D) *Northern Blot* e citometria de fluxo.

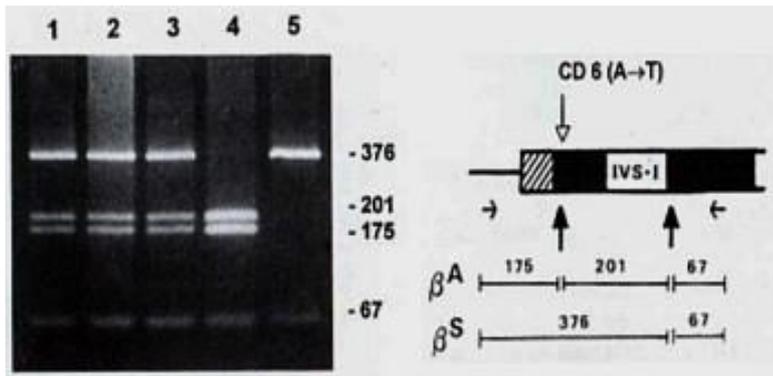
22.(IADES - Fundação Hemocentro de Brasília - DF - 2017) O teste SeptiFast consiste em um método molecular de amplificação *in vitro* de ácidos nucleicos para

- A) detecção e identificação de DNA de 25 espécies de bactérias e fungos causadores de 90% de todas as infecções sanguíneas.
- B) detecção de variantes genéticas, incluindo deleções e duplicações, para os genes CYP2D6 e CYP2C19, que têm papel primordial no metabolismo de medicamentos.
- C) detecção qualitativa de RNA do HIV-1 Grupo M, HIV-1 Grupo O, HCV e DNA do HBV em amostras de plasma de doadores.
- D) detecção e genotipagem do vírus do papiloma humano de 33 genótipos mais relevantes.



E) determinação da carga viral de citomegalovírus para acompanhamento de paciente de alto risco e monitorização da resposta à terapêutica.

23.(UFG - 2018) A figura a seguir representa o resultado da eletroforese em gel de agarose do DNA de cinco pacientes com suspeita de serem portadores de hemoglobina S, após a amplificação por PCR e digestão com a enzima de restrição DdeI. Pacientes com mutação no códon 6 do gene beta β SCD6(A→T) perdem o sítio de restrição (GAG para GTG), conforme diagrama ilustrado na figura.



NAGEL, R. L. Hemoglobin Disorders. Molecular Methods and Protocols. Humana Press. 2003.

Considerando as informações descritas, o resultado do perfil genotípico esperado para os pacientes de 1 a 5 é

- A) pacientes 1 a 3 = perfil AA; paciente 4 = perfil SS; paciente 5 = perfil AS.
- B) pacientes 1 a 3 = perfil AS; paciente 4 = perfil SS; paciente 5 = perfil AA.
- C) pacientes 1 a 3 = perfil AA; paciente 4 = perfil AS; paciente 5 = perfil SS.
- D) pacientes 1 a 3 = perfil AS; paciente 4 = perfil AA; paciente 5 = perfil SS.

QUESTÕES COMENTADAS



1. (UFG - 2018) A hibridização é uma técnica para a identificação de moléculas específicas de DNA e RNA por meio do uso de sondas. Nesse aspecto, o princípio da hibridização é empregado em análises por microarranjos (*microarray*), que é uma técnica constituída

A) pela ligação de centenas a milhares de seqüências de DNA desconhecidas a uma superfície sólida, como uma placa de plástico ou lâmina, por exemplo.

B) pela hibridização das seqüências "alvo" ao arranjo de sondas de DNA, gerando uma intensidade de sinal a cada espécie de DNA no arranjo, correspondente ao nível de expressão do gene em questão.

C) por seqüências de DNA fixas não marcadas, chamadas de "alvo", porque são seqüências conhecidas, enquanto as seqüências "sonda" são compostas de c-DNAs marcados e amplificados, a partir de um RNA total de uma célula ou tecido.

D) pela quantidade de mRNA em uma amostra, em vez do seu tamanho, conforme o princípio da técnica de hibridização de *Southern blot*. Nesse caso, a quantidade de hibridização reflete o nível de expressão do gene que codifica o mRNA em questão.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. As amostras de DNA ligadas à superfície não são desconhecidas, elas possuem seqüências conhecidas.

A **alternativa B** está correta e é o gabarito da questão. No *microarray*, os sinais gerados correspondem à expressão de genes alvo específicos que se ligaram a sondas fixadas na placa.

A **alternativa C** está incorreta. As seqüências "sonda" são compostas por DNA não marcado, e são fixas na placa. As seqüências "alvo" são cDNAs de seqüência desconhecida, marcados e não fixos.

A **alternativa D** está incorreta. A técnica de *microarray* não analisa o mRNA diretamente, mas o cDNA gerado a partir dele.

2. (UFTM - 2019) Assinale a opção que contém o conjunto de palavras que melhor completa a frase abaixo:



A hibridização *in situ* é uma técnica ideal para: (1) determinar se uma célula tem uma sequência específica de DNA (como um _____ ou parte dele), (2) identificar células contendo mRNAs específicos (o qual corresponde a um gene sendo _____) e (3) determinar a localização de um gene (em um _____ específico).

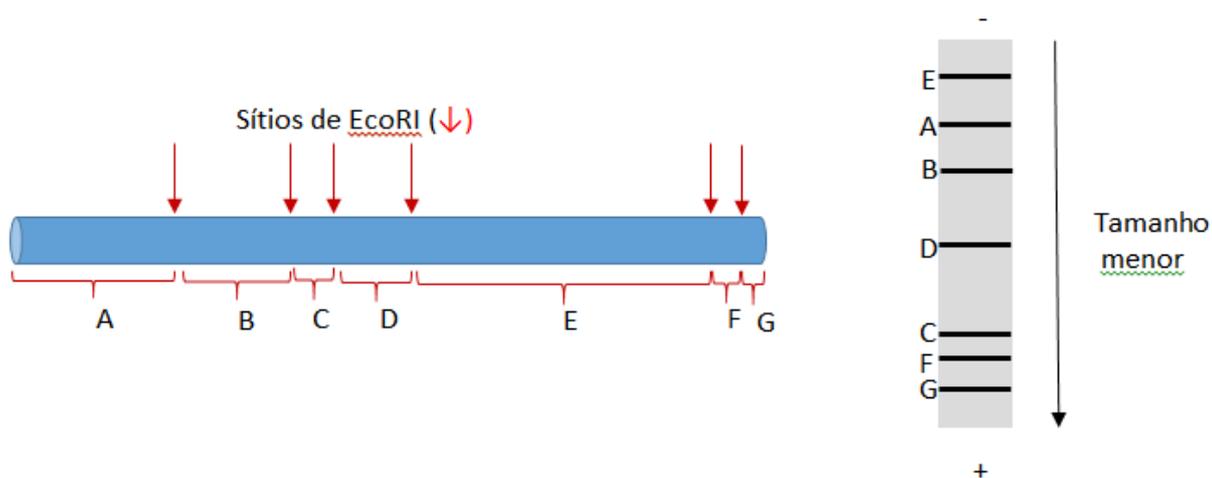
- A) gene/hibridizado/núcleo.
- B) exon/transportado/cromossomo.
- C) gene/transcrito/cromossomo.
- D) intron/silenciado/ribossomo.

Comentários:

A hibridização *in situ* é uma técnica ideal para: (1) determinar se uma célula tem uma sequência específica de DNA (como um gene ou parte dele), (2) identificar células contendo mRNAs específicos (o qual corresponde a um gene sendo transcrito) e (3) determinar a localização de um gene (em um cromossomo específico).

Gabarito: alternativa C.

3. (UFG - 2018) Para realizar a análise dos ácidos nucleicos ou o estudo de genomas, são utilizadas várias técnicas de biologia molecular. O polimorfismo por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição, é uma dessas técnicas e utiliza enzimas de restrição que clivam o DNA em pontos específicos, gerando fragmentos de diferentes tamanhos que são separados e visualizados em forma de bandas. A figura a seguir representa uma digestão de um fragmento de DNA com a endonuclease Eco RI.



WATSON, J.D. et al. *Biologia molecular do gene*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. (Adaptado).



Considerando a figura apresentada, a enzima de restrição EcoRI possui

- A) sete sítios de restrição, e clivou o fragmento de DNA em sete fragmentos de tamanhos diferentes, o menor deles representado pela letra A.
- B) sete sítios de restrição, e clivou o fragmento de DNA em sete fragmentos de tamanhos diferentes, o maior deles representado pela letra E.
- C) seis sítios de restrição, e clivou o fragmento de DNA em sete fragmentos de tamanhos diferentes, o maior deles representado pela letra E.
- D) seis sítios de restrição, e clivou o fragmento de DNA em sete fragmentos de tamanhos diferentes, o maior deles representado pela letra A.

Comentários:

Pela figura da esquerda podemos perceber que a enzima de restrição EcoRI **clivou o DNA em 6 sítios** diferentes, dando origem a **7 fragmentos**. Na imagem da esquerda podemos ver os **7 fragmentos** de DNA após uma corrida eletroforética, estando o **maior fragmento na parte de cima e o menor na parte de baixo**. Assim sendo, **o maior fragmento é o "E" e o menor é o "G"**.

Gabarito: letra C.

4. (AOCP - SUSIPE-PA - 2018) A utilização de técnicas laboratoriais de biologia molecular é primordial para o diagnóstico de determinadas doenças. As principais técnicas utilizam certas enzimas para que a análise do DNA seja possibilitada. Dentre essas técnicas, uma das mais conhecidas é a PCR. Sobre a PCR, assinale a alternativa que apresenta a enzima base para a realização dos seus procedimentos.

- A) Transcriptase reversa.
- B) DNA coloidase.
- C) DNA polimerase.
- D) DNA sintetase.
- E) Transcriptase lisosterase.

Comentários:

A enzima utilizada na técnica de PCR é a **DNA polimerase**, que sintetiza novas fitas de DNA, amplificando o material genético.

Gabarito: alternativa C.



5. (COMPERVE/UFRN - Pref. Natal/RN - 2018) Os plasmídeos são pequenos segmentos de DNA circular com replicação independente, presentes em bactérias, e proporcionam a transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos entre bactérias de diferentes gêneros através da conjugação. Alguns plasmídeos são identificados e classificados por sequenciamento completo de DNA. Para sequenciar um plasmídeo, faz-se necessária uma grande quantidade de cópias desse DNA. A técnica adequada para a clonagem e amplificação desse DNA é

- A) o sequenciamento automatizado.
- B) a eletroforese de DNA em gel.
- C) o *southern blotting* em nitrocellulose.
- D) a reação em cadeia da polimerase.

Comentários:

De acordo com o que aprendemos nessa aula, a técnica que **amplifica o DNA**, gerando uma **grande quantidade de cópias** é a **reação em cadeia da polimerase** (PCR).

Gabarito: alternativa D.

6. (IBFC - SESACRE - 2019) Técnica baseada na amplificação enzimática de um fragmento de DNA através de repetidos ciclos com variação de temperatura, resultando num acúmulo exponencial de um fragmento específico. Sobre o nome da técnica de biologia molecular descrita, assinale a alternativa correta.

- A) *Southern blotting*
- B) Eletroforese em campo pulsátil
- C) Reação em cadeia da polimerase
- D) *Western blotting*

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. O *southern blotting* é uma técnica de **hibridização**, usada para detectar e identificar moléculas de **DNA** através de sondas de ácidos nucleicos marcadas.

A **alternativa B** está incorreta. A **eletroforese** é uma técnica que usa uma matriz em **gel**, sob a qual incide uma **carga elétrica**, para **separar moléculas** de tamanho e carga diferentes.

A **alternativa C** está correta e é o gabarito da questão. A **reação em cadeia da polimerase** é uma técnica de análise do DNA que utiliza a enzima **DNA polimerase** e realiza vários **ciclos de variações de temperatura**, levando a uma **amplificação exponencial** do DNA.



A **alternativa D** está incorreta. O *western blotting* é uma técnica de **hibridização**, usada para detectar e identificar **proteínas** através de anticorpos marcados.

7. (IBFC - SESACRE - 2019) É consenso que a PCR (*Polymerase Chain Reaction*; reação em cadeia de polimerase) é uma das técnicas que mais revolucionou a medicina nos últimos tempos, tornando a medicina molecular um verdadeiro ramo da clínica médica. Com relação à Técnica de PCR, analise as afirmativas abaixo e assinale a alternativa correta.

- A) A PCR não permite que o ácido nucléico-alvo seja especificamente selecionado
- B) A amplificação do *primer* não é exponencial
- C) Sua técnica, apesar de revolucionária, possui um tempo de reação longo, em sua maioria cerca de 20 horas
- D) Amplifica por milhares de vezes o alvo selecionado

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. Na PCR, o DNA é selecionado por *primers* específicos, o que leva a uma amplificação específica da sequência alvo.

A **alternativa B** está incorreta. Na PCR, a amplificação do DNA ocorre de forma exponencial.

A **alternativa C** está incorreta. O tempo total da PCR é de poucas horas, sendo uma técnica relativamente rápida.

A **alternativa D** está correta e é o gabarito da questão. Na PCR, a sequência alvo é amplificada de forma exponencial, podendo chegar a milhões de cópias.

8. (UFMT - Pref. Várzea Grande/MT - 2018) O diagnóstico laboratorial de várias doenças infecciosas pode ser realizado por meio de técnicas moleculares.

Para algumas doenças virais, a determinação da Carga Viral é imprescindível para o acompanhamento e tratamento do paciente. Qual técnica molecular é utilizada para a determinação da carga viral?

- A) Nested PCR
- B) PCR RFLP
- C) *Real Time* PCR
- D) PCR Convencional



Comentários:

Para determinação da carga viral, é necessário ter um resultado **quantitativo**. A técnica de PCR que revela resultados quantitativos é a PCR em tempo real, também chamada de **real time PCR** ou simplesmente PCR quantitativa (qPCR).

Gabarito: alternativa C.

9. (UFG - 2018) A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que foi aperfeiçoada ao longo de décadas, tornando possível a amplificação seletiva de sequências de DNA de pacientes. É utilizada como um instrumento de análise de rotina nos laboratórios de diagnósticos e pesquisa. O princípio dessa técnica é

A) amplificar regiões específicas do genoma ou de transcritos por meio de repetições das etapas de desnaturação, anelamento e polimerização, em média de 20 a 30 ciclos. A etapa de polimerização é realizada pela adição de enzima DNA polimerase após cada ciclo de desnaturação.

B) amplificar segmentos previamente definidos da molécula de DNA, sendo necessária a síntese de iniciadores específicos que amplificam o fragmento desejado a cada ciclo, que compreende três etapas: desnaturação, hibridização e extensão.

C) possibilitar, em tempo real (qPCR), o acompanhamento da amplificação do DNA em todo o processo e não somente no final. Para que isso ocorra, as etapas obedecem à seguinte ordem: desnaturação, anelamento, polimerização e transcrição reversa.

D) permitir a hibridização *in situ* por fluorescência, cujas etapas ocorrem na seguinte ordem: desnaturação, anelamento ou hibridização, extensão ou polimerização.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. As etapas da PCR são desnaturação, anelamento e extensão. Não existe etapa de **polimerização**.

A **alternativa B** está correta e é o gabarito da questão. Esta é a única alternativa que descreve de forma correta o princípio da técnica de PCR.

A **alternativa C** está incorreta. As etapas da PCR são desnaturação, anelamento e extensão. Não existe etapa de **polimerização**. A **transcrição reversa** é uma etapa realizada antes da amplificação do material genético, quando se utiliza a técnica de **PCR com transcrição reversa**.

A **alternativa D** está incorreta. A técnica de hibridização *in situ* por fluorescência é uma técnica diferente da PCR.



10.(Quadrix - SEDF - 2018 - adaptada) No que concerne às técnicas de engenharia genética, julgue os itens que se seguem.

I. O uso de PCR e *primers*, que atuam como sondas, por complementaridade específica ao DNA do microrganismo-alvo, permite identificar a presença de patógenos em amostras biológicas, mesmo que estejam em baixa quantidade.

II. Na PCR, utiliza-se uma DNA-polimerase capaz de produzir várias cópias de moléculas de fita dupla de DNA. Essa técnica envolve a repetição de um ciclo com três etapas: desnaturação; anelamento; e extensão.

- A) As duas afirmativas estão corretas.
- B) A afirmativa I está correta e a afirmativa II está errada.
- C) A afirmativa II está correta e a afirmativa I está errada.
- D) As duas afirmativas estão erradas.

Comentários:

A **afirmativa I** está **correta**. Na PCR, os *primers* são utilizados para detecção específica da sequência alvo, que será amplificada exponencialmente. Mesmo que a amostra inicial tenha pequenas quantidades de DNA, ao final da técnica o material genético terá se amplificado em milhões de cópias.

A **afirmativa II** também está **correta**. As etapas da PCR são desnaturação, anelamento e extensão. Na etapa de extensão, a DNA polimerase sintetiza novas fitas de DNA, amplificando o material genético.

Logo, as duas afirmativas estão corretas.

Gabarito: alternativa A.

11.(CESGRANRIO - UNIRIO - 2019) Para o diagnóstico molecular de doenças virais, depara-se tanto com vírus cujo material genético é constituído de DNA, quanto com vírus constituído de RNA.

Para o diagnóstico de viroses causadas por vírus do tipo RNA, que tipo de método molecular deve ser utilizado?

- A) RT-PCR
- B) IFI
- C) PCR
- D) Nested PCR
- E) Hibridação *in situ*



Comentários:

A **PCR com transcrição reversa (RT-PCR)** começa com uma **amostra de RNA** e realiza um processo inverso à transcrição, produzindo uma molécula de DNA complementar (cDNA) através do uso de uma enzima conhecida como **transcriptase reversa**. A RT-PCR é amplamente utilizada no diagnóstico de **doenças virais**, pois alguns vírus (como o HIV) possuem RNA como material genético.

Gabarito: alternativa A.

12.(UFTM - 2019) A PCR (reação em cadeia da polimerase) requer todos os componentes seguintes, EXCETO:

- A) Iniciadores.
- B) DNA ligase.
- C) DNA polimerase.
- D) Desoxirribonucleotídeos.

Comentários:

Os componentes da PCR são amostra de DNA, DNA polimerase, *primers* (iniciadores), dNTPs (desoxirribonucleotídeos) e solução tampão. A **DNA ligase** não é utilizada na PCR.

Gabarito: alternativa B.

13.(UFTM - 2019) Em relação a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), todas as alternativas estão corretas, EXCETO:

- A) Quando se deseja amplificar RNA por PCR, a molécula deve inicialmente ser convertida em cDNA complementar, pela enzima transcriptase reversa.
- B) A PCR convencional permite a obtenção de dados quantitativos sobre as sequências pesquisadas.
- C) Uma das limitações técnicas do PCR para diagnóstico é a facilidade de contaminação do equipamento podendo levar a resultados falsos-positivos.
- D) O resultado da técnica de PCR em tempo real é dado em escala exponencial.

Comentários:

A **alternativa A** está correta. Este procedimento é realizado na técnica de PCR com transcrição reversa (RT-PCR) e tem aplicação na investigação de infecções causadas por vírus de RNA.



A **alternativa B** está INCORRETA e é o gabarito da questão. A PCR convencional é **qualitativa**, e não **quantitativa**.

A **alternativa C** está correta. A PCR pode ser facilmente contaminada por DNAs não pertencentes à amostra em estudo.

A **alternativa D** está correta. A amplificação em todas as variações da técnica PCR ocorre de forma exponencial.

14.(UFTM - 2019) Em relação a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), a primeira etapa do procedimento é:

- A) Amplificação.
- B) Dissociação.
- C) Desnaturação.
- D) Anelamento.

Comentários:

A sequência das etapas da PCR é **desnaturação**, anelamento e extensão.

Gabarito: alternativa C.

15.(UFTM - 2019) As sondas utilizadas na hibridização *in situ* precisam estar ligadas a um marcador que permita a posterior visualização e localização no interior de uma célula ou tecido. São exemplos de marcadores usados na hibridização *in situ*, EXCETO:

- A) radioisótopo 35 do enxofre.
- B) radioisótopo 137 do célio.
- C) digoxigenina.
- D) radioisótopo 33 do fósforo.

Comentários:

Dentre os marcadores utilizados na técnica de hibridização *in situ*, pode-se citar: radioisótopo 35 do enxofre, digoxigenina e radioisótopo 33 do fósforo. O **radioisótopo 137 do célio** não é um marcador utilizado na hibridização *in situ*.

Gabarito: alternativa B.



16.(UFTM - 2019) Hibridização *in situ* é uma técnica que permite a detecção de ácidos nucleicos em células e tecidos, preservando a sua morfologia. Para esse fim são usadas sondas de cadeias simples de RNA ou DNA que devem apresentar a seguinte característica em relação à sequência alvo:

- A) A sonda deve ser isomérica em relação à cadeia alvo.
- B) A sonda deve reconhecer epítomos da cadeia alvo.
- C) A sonda deve ser idêntica em relação à cadeia alvo.
- D) A sonda deve ser complementar em relação à cadeia alvo.

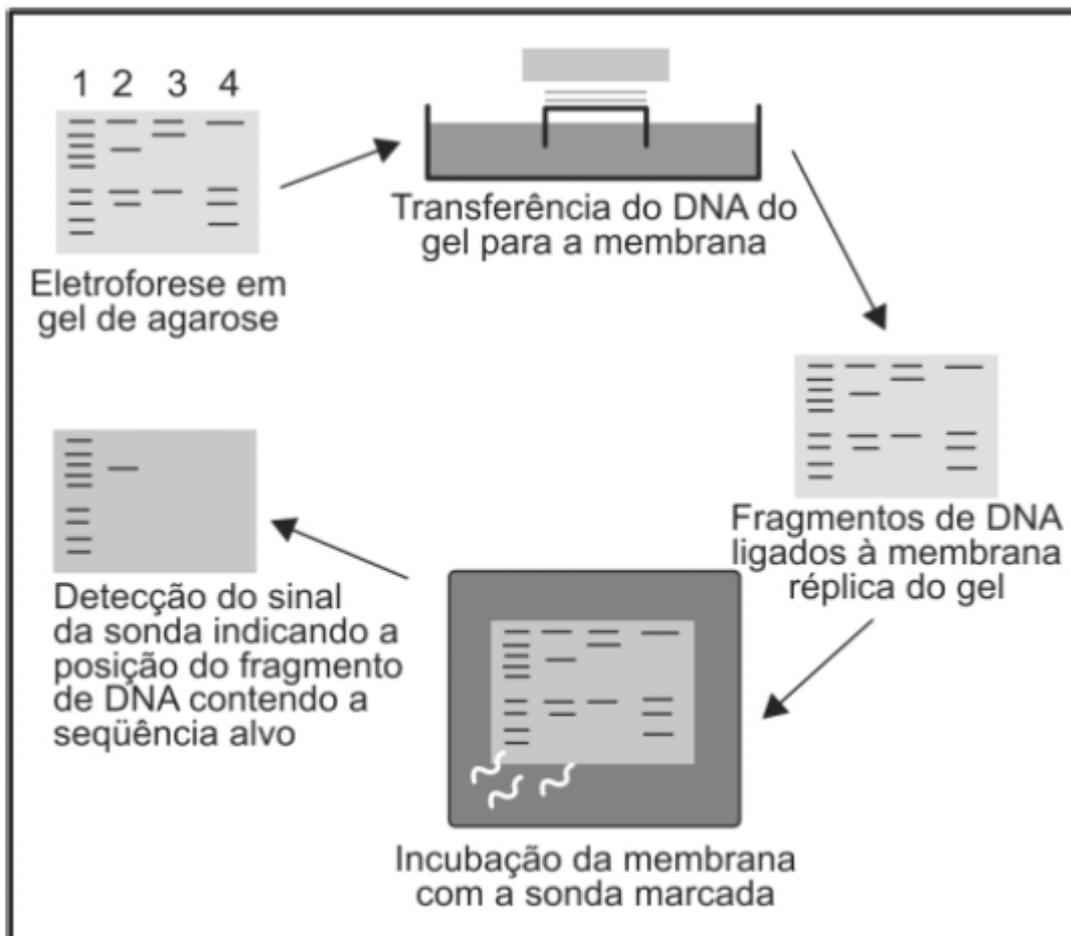
Comentários:

As sondas utilizadas na técnica de hibridização *in situ* devem ser **complementares** à cadeia alvo.

Gabarito: alternativa D.

17.(FCC - Prefeitura de Macapá - AP - 2018) Considere a figura abaixo.





Legenda: Na eletroforese, 1 corresponde ao padrão de DNA de tamanho conhecido, 2, 3 e 4 são amostras de DNA a serem analisadas.

Macedo *et al.* Técnicas de Biologia Molecular e Clonagem. Ed. Educacional, 2012.

As etapas apresentadas na figura correspondem à técnica de

- A) *Southern blotting*.
- B) *Western blotting*.
- C) PCR.
- D) ELISA indireto.
- E) Pareamento indireto de DNA.

Comentários:

A **alternativa A** está correta e é o gabarito da questão. As etapas apresentadas na figura correspondem à técnica de **southern blotting**, que é um método de análise do **DNA** a partir de sondas de ácidos nucleicos marcadas.



A **alternativa B** está incorreta. *Western blotting* é uma técnica de hibridização que detecta proteínas, e não DNA.

A **alternativa C** está incorreta. PCR é uma técnica de amplificação do DNA, e não de hibridização.

A **alternativa D** está incorreta. ELISA é um método imunológico, que se baseia na ligação entre antígeno e anticorpo.

A **alternativa E** está incorreta. Pareamento indireto de DNA não é uma técnica conhecida.

18. (FCC - Prefeitura de Macapá - AP - 2018) Considere o trecho abaixo retirado de um artigo científico.

As proteínas de *T. gondii* a serem usadas no IgG-WB foram quantificadas com o método de Lowry *et al.* e o gel de poliacrilamida 12% foi usado na separação eletroforética de proteínas com a transferência subsequente das proteínas para uma membrana de nitrocelulose. O papel de nitrocelulose foi manchado com Ponceau e, após lavagem com água destilada, as tiras de nitrocelulose foram cortadas e bloqueadas com leite desnatado a 5% mais Tween® salina tamponada com Tris (TBS). Posteriormente, lavou-se as tiras com TBS e leite desnatado a 5% e, então, adicionou-se o soro do paciente diluído em Tween TBS e leite desnatado a 5%, lavou-se e adicionou-se conjugado IgG anti-humano diluído em Tween TBS e leite desnatado a 5%. Após lavagens adicionais, o substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB) a 0,2% e peróxido de hidrogênio (100 µL) foi adicionado. Quando as bandas foram visualizadas, a reação foi interrompida com água destilada. As amostras de controle positivo e negativo de anti-*T. gondii* foram incluídas em cada teste.

(Adaptado de Capobianco, J.D. *et al.*, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br>)

A técnica utilizada foi a de

- A) PCR.
- B) *Northern blotting*.
- C) ELISA.
- D) *Western blotting*.
- E) Citometria de fluxo.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. A técnica de PCR é utilizada para amplificar amostras de DNA.

A **alternativa B** está incorreta. A técnica de *Northern blotting* é utilizada para detectar moléculas de RNA com sondas de ácidos nucleicos marcadas.



A **alternativa C** está incorreta. ELISA é um método imunológico, que se baseia na ligação entre antígeno e anticorpo. Não se utiliza eletroforese nem transferência para membranas de nitrocelulose na técnica de ELISA.

A **alternativa D** está correta e é o gabarito da questão. A técnica utilizada foi a de **Western blotting**, pois utilizou-se **anticorpos** IgG para detectar **proteínas** de *T. gondii*.

A **alternativa E** está incorreta. A técnica de citometria é utilizada para identificação e separação de células e partículas.

19.(FCC - Prefeitura de Macapá - AP - 2018) Atualmente não se pode mais falar em diagnóstico rápido e preciso sem o uso de técnicas moleculares de diagnóstico. Considere, como exemplo, o diagnóstico do HPV (Papiloma Vírus Humano), que possui DNA circular, apresenta mais de 100 genótipos, dos quais grande parte está relacionada a processos malignos e lesões precursoras em cérvix uterinas. Dentre estas técnicas, a PCR detecta e identifica o material genômico dos HPVs, o que permite saber se o vírus é de alto ou baixo risco oncogênico. Sobre essa técnica é correto afirmar:

A) Dentre as etapas básicas da técnica estão a desnaturação com resfriamento da amostra, seguida do aquecimento para o anelamento e depois o resfriamento novamente para a síntese de novas fitas.

B) Atualmente existem várias modificações da técnica de PCR convencional, sendo as principais a PCR em Tempo Real ou Q-PCR (PCR quantitativa) e RT-PCR (PCR por Transcrição Reversa, para se amplificar amostras de DNA).

C) Os produtos amplificados por PCR podem ser clivados com enzimas de restrição e os fragmentos obtidos são comparados para identificação do subtipo viral, o que permite classificar seu grau de risco.

D) Para identificação dos subtipos de HPV é utilizada uma mesma sequência iniciadora (*primer*).

E) Uma reação de PCR convencional utiliza DNase, DNA molde, nucleotídeos e polimerase.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. A desnaturação ocorre com o aquecimento da amostra. Entre a desnaturação e o anelamento acontece um resfriamento. E entre o anelamento e extensão (etapa de síntese de novas fitas) ocorre um reaquecimento.

A **alternativa B** está incorreta. A técnica de RT-PCR amplifica amostras de cDNA, oriundas de amostras de RNA.

A **alternativa C** está correta e é o gabarito da questão. Esta metodologia corresponde à PCR RFLP, que detecta polimorfismos presentes nas amostras analisadas.

A **alternativa D** está incorreta. Cada par de *primer* é específico para cada sequência alvo.



A **alternativa E** está incorreta. Não se usa DNase na técnica de PCR.

20.(FCC - Prefeitura de Macapá - AP - 2018) Uma importante técnica de biologia molecular, por meio de etapas de variação de temperatura, possibilita a duplicação de cadeias de DNA *in vitro*, através do emprego dos quatro nucleotídeos (dNTP's) do DNA, sequências iniciadoras (*primers*) e uma DNA polimerase termoestável. Esta técnica é denominada

- A) *Western Blotting*.
- B) PCR.
- C) ELISA.
- D) *Southern Blotting*.
- E) Imuno-histoquímica.

Comentários:

A **alternativa A** está incorreta. *Western blotting* é uma técnica de hibridização que detecta proteínas através de anticorpos marcados.

A **alternativa B** está correta e é o gabarito da questão. O enunciado descreveu a técnica de PCR, utilizada para amplificação do DNA.

A **alternativa C** está incorreta. ELISA é um método imunológico, que se baseia na ligação entre antígeno e anticorpo.

A **alternativa D** está incorreta. A técnica de *Southern blotting* é utilizada para detectar moléculas de DNA com sondas de ácidos nucleicos marcadas.

A **alternativa E** está incorreta. A imuno-histoquímica é uma técnica que utiliza anticorpos para detectar antígenos celulares (como proteínas ou outras macromoléculas) em uma amostra de tecido.

21.(CS-UFG - 2017) A identificação e quantificação de moléculas específicas em células e tecidos pode ser realizada pela interação antígeno-anticorpo. Quais metodologias utilizam dessa interação para identificação molecular?

- A) *Northern Blot* e qRT-PCR.
- B) *Western Blot* e citometria de fluxo.
- C) *Southern Blot* e espectrometria de massa.
- D) *Northern Blot* e citometria de fluxo.



Comentários:

O **western blot** é a técnica que se baseia na especificidade da ligação entre antígeno e anticorpo para identificação de proteínas. Como estudamos em aulas anteriores, a **citometria** de fluxo também é uma técnica que faz uso de anticorpos marcados.

Nenhuma das outras técnicas citadas nas outras alternativas utiliza a interação entre antígeno e anticorpo para identificação molecular.

Gabarito: alternativa B.

22. (IADES - Fundação Hemocentro de Brasília - DF - 2017) O teste SeptiFast consiste em um método molecular de amplificação *in vitro* de ácidos nucleicos para

- A) detecção e identificação de DNA de 25 espécies de bactérias e fungos causadores de 90% de todas as infecções sanguíneas.
- B) detecção de variantes genéticas, incluindo deleções e duplicações, para os genes CYP2D6 e CYP2C19, que têm papel primordial no metabolismo de medicamentos.
- C) detecção qualitativa de RNA do HIV-1 Grupo M, HIV-1 Grupo O, HCV e DNA do HBV em amostras de plasma de doadores.
- D) detecção e genotipagem do vírus do papiloma humano de 33 genótipos mais relevantes.
- E) determinação da carga viral de citomegalovírus para acompanhamento de paciente de alto risco e monitorização da resposta à terapêutica.

Comentários:

O **SeptiFast** é uma técnica de **PCR multiplex** que permite a detecção de **25 patógenos comuns do sangue**, possuindo a vantagem de ser uma técnica consideravelmente mais rápida que uma hemocultura convencional. Por este motivo, é um método empregado para diagnóstico de **infecções da corrente sanguínea**.

Gabarito: alternativa A.

23. (UFG - 2018) A figura a seguir representa o resultado da eletroforese em gel de agarose do DNA de cinco pacientes com suspeita de serem portadores de hemoglobina S, após a amplificação por PCR e digestão com a enzima de restrição Ddel. Pacientes com mutação no códon 6 do gene beta β SCD6(A→T) perdem o sítio de restrição (GAG para GTG), conforme diagrama ilustrado na figura.





NAGEL, R. L. Hemoglobin Disorders. Molecular Methods and Protocols. Humana Press. 2003.

Considerando as informações descritas, o resultado do perfil genotípico esperado para os pacientes de 1 a 5 é

- A) pacientes 1 a 3 = perfil AA; paciente 4 = perfil SS; paciente 5 = perfil AS.
- B) pacientes 1 a 3 = perfil AS; paciente 4 = perfil SS; paciente 5 = perfil AA.
- C) pacientes 1 a 3 = perfil AA; paciente 4 = perfil AS; paciente 5 = perfil SS.
- D) pacientes 1 a 3 = perfil AS; paciente 4 = perfil AA; paciente 5 = perfil SS.

Comentários:

Essa questão apresenta resultados de uma técnica de PCR RFLP. A partir da análise do esquema à direita e da imagem da corrida eletroforética à esquerda, podemos identificar 3 tipos de indivíduos:

Perfil AA - Indivíduos saudáveis (homozigotos para o gene da hemoglobina A) irão apresentar 3 bandas no gel: uma de 67 pares de base (pb), uma de 175 pb e uma de 201 pb.

Perfil SS - Indivíduos com anemia falciforme (homozigotos para o gene da hemoglobina S) irão apresentar apenas 2 bandas no gel: uma banda de 67 pb e uma banda com 376 pb, pois eles não têm o sítio de restrição que dividiria este fragmento em dois (de 175 pb e 201 pb).

Perfil AS - Indivíduos heterozigotos (com uma cópia do gene da hemoglobina A e uma cópia do gene da hemoglobina S) irão apresentar 4 bandas no gel: uma de 67 pb, uma de 175 pb, uma de 201 pb e uma com 376 pb, pois as bandas dos dois alelos serão reveladas.

Dessa forma, podemos concluir que os pacientes 1 a 3 apresentam perfil AS, o indivíduo 4 é AA e o indivíduo 5 é SS.

Gabarito: alternativa D.

GABARITO



GABARITO

1. B
2. C
3. C
4. C
5. D
6. C
7. D
8. C

9. B
10. A
11. A
12. B
13. B
14. C
15. B
16. D

17. A
18. D
19. C
20. B
21. B
22. A
23. D



REFERÊNCIAS

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science, 2002.

Griffiths, Anthony J,F.; Wessler, Susan R.; Carroll, Sean B.; Doebley, John. Introdução à genética. 11. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

Nussbaum, Robert L.; McInnes, Roderick R.; Willard, Huntington F.; Hamosh, Ada. Thompson & Thompson Genética Médica. 7. ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

Scitable by Nature Education. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/>>. Acesso em: 10 abr 2020.

Shyamala, V. Nucleic Acid Technology (NAT) testing for blood screening: impact of individual donation and Mini Pool–NAT testing on analytical sensitivity, screening sensitivity and clinical sensitivity. ISBT Science Series, v. 9, n. 2, p. 315-324, 2014.



ESSA LEI TODO MUNDO CONHECE: PIRATARIA É CRIME.

Mas é sempre bom revisar o porquê e como você pode ser prejudicado com essa prática.



1 Professor investe seu tempo para elaborar os cursos e o site os coloca à venda.



2 Pirata divulga ilicitamente (grupos de rateio), utilizando-se do anonimato, nomes falsos ou laranjas (geralmente o pirata se anuncia como formador de "grupos solidários" de rateio que não visam lucro).



3 Pirata cria alunos fake praticando falsidade ideológica, comprando cursos do site em nome de pessoas aleatórias (usando nome, CPF, endereço e telefone de terceiros sem autorização).



4 Pirata compra, muitas vezes, clonando cartões de crédito (por vezes o sistema anti-fraude não consegue identificar o golpe a tempo).



5 Pirata fere os Termos de Uso, adultera as aulas e retira a identificação dos arquivos PDF (justamente porque a atividade é ilegal e ele não quer que seus fakes sejam identificados).



6 Pirata revende as aulas protegidas por direitos autorais, praticando concorrência desleal e em flagrante desrespeito à Lei de Direitos Autorais (Lei 9.610/98).



7 Concurseiro(a) desinformado participa de rateio, achando que nada disso está acontecendo e esperando se tornar servidor público para exigir o cumprimento das leis.



8 O professor que elaborou o curso não ganha nada, o site não recebe nada, e a pessoa que praticou todos os ilícitos anteriores (pirata) fica com o lucro.



Deixando de lado esse mar de sujeira, aproveitamos para agradecer a todos que adquirem os cursos honestamente e permitem que o site continue existindo.