

# INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA (INPA)

## CARGO 60: TECNOLOGISTA PLENO 2 – ESPECIALIDADE: T10 ÁREA DE ATUAÇÃO: CITOMETRIA DE FLUXO E IMUNOFENOTIPAGEM

### Prova Discursiva – Questão 1

Aplicação: 24/03/2024

## PADRÃO DE RESPOSTA DEFINITIVO

### **Princípios metodológicos da citometria de fluxo a tornam uma ferramenta de grande importância na prática clínica dos laboratórios**

A citometria de fluxo (CF) é uma tecnologia que mede e analisa simultaneamente várias características de células ou partículas em uma suspensão líquida, enquanto passam individualmente em um fluxo contínuo através de um feixe de luz. Em geral, os citômetros de fluxo são compostos por três principais subsistemas: fluídico, óptico e eletrônico. Os três subsistemas trabalham em conjunto para medir simultaneamente várias características físicas de partículas à medida que se movem em um fluxo contínuo e passam através de um ou mais feixes de luz que geralmente são lasers.

Os lasers são escolhidos porque produzem um feixe de alta intensidade de luz monocromática. Eles também têm um diâmetro pequeno, o que é importante, pois a luz precisa ser focada em um pequeno volume para obter a excitação máxima de uma única célula e minimizar a probabilidade de haver mais de uma célula no feixe. O laser primário mais comum é um *laser* de íons de argônio resfriado a ar, produzindo luz azul a 488 nm. Contudo há vários outros tipos de *lasers*, tanto resfriados a ar como de estado sólido que produzem luz nos comprimentos de onda entre 325 nm e 780 nm.

O subsistema fluídico transporta partículas desde sua aquisição oriunda do tubo de amostra, através de um fluxo contínuo até chegarem no feixe de laser onde são interceptadas. A porção da corrente do fluido onde as partículas estão localizadas é chamada de núcleo de amostra. O ponto em que as partículas encontram o feixe de laser é o ponto de interrogação. A luz incidente do laser é dispersa e a fluorescência é emitida quando as partículas passam pelo chamado ponto de interrogação.

O subsistema óptico consiste em componentes de excitação e coleta. Os componentes de excitação incluem as fontes de lasers, prismas e lentes de modelagem de feixe de laser para direcioná-los para o núcleo da amostra. Quando as partículas passam pelo ponto de interrogação do laser, elas dispersam a luz, e qualquer molécula fluorescente presente na partícula emite fluorescência. Lentes posicionadas adequadamente coletam a luz dispersada e a fluorescência emitida, enquanto outros componentes do subsistema óptico as direcionam para os detectores apropriados.

Com um número crescente de corantes fluorescentes disponíveis e uma gama crescente de anticorpos monoclonais, as aplicações tem crescido em ritmo acelerado. Os corantes fluorescentes podem ser usados para marcar diretamente os componentes celulares, como o DNA, e outros podem ser ligados a anticorpos contra uma grande variedade de proteínas celulares.

A principal vantagem desta metodologia reside na capacidade de fazer medições em um grande número de células únicas dentro de um curto período de tempo, podendo-se revelar a heterogeneidade de populações celulares em uma única amostra, identificando e quantificando diferentes subconjuntos de células. E, além disso, possui a capacidade de analisar vários parâmetros simultaneamente numa única célula, sendo por isso uma das principais técnicas de escolha para análises multiparamétricas nas áreas de imunologia, biologia celular e molecular, microbiologia, parasitologia, em estudos de avaliação funcional e diferenciação de populações celulares, imunofenotipagem, conteúdo de ácidos nucleicos, atividades enzimáticas, avaliação da proliferação, ciclo celular e morte celular (por necrose ou apoptose), expressão e modulação de receptores, produção de citocinas, entre outros. Na área da hematologia, a citometria de fluxo é suporte de diagnóstico padrão ouro para diversas alterações que incluem leucemias agudas e crônicas, linfomas, síndromes mielodisplásicas, mieloma múltiplo, entre outras doenças. Além disso, a citometria também auxilia no monitoramento de recidiva e no controle prognóstico destes pacientes.

Uma outra aplicação de grande destaque na CF é a separação de uma determinada população celular a partir de uma suspensão heterogênea de células, processo denominado *sorting*. Assim, há dois tipos de citômetros de fluxo produzidos comercialmente, os citômetros analisadores e os citômetros separadores de células, denominados de *cell sorters*.

### **Surgimento dos consensos para padronização e harmonização de resultados em diferentes laboratórios**

Um dos desafios ainda não totalmente resolvidos para a citometria clínica é a padronização dos dados e das frequências e valores absolutos de várias populações celulares analisadas, especialmente se os dados forem gerados a partir de diferentes instrumentos e de diferentes empresas. O problema é ainda mais difícil quando se trata de comparar a expressão dos marcadores em amostras recém-colhidas para evitar alteração da expressão após processos de congelamento. Ademais, as variações de fluorescência entre diferentes lotes de anticorpos também podem ser um grande problema, os resultados divergentes podem ser vistos como resultado de estratégias de controle inadequadas entre os centros ou devido a uma compensação de fluorescência imperfeita.

Neste sentido vários grupos formados por especialistas na área da citometria de fluxo no mundo todo foram montados em favor de uma padronização comum de métodos de análise que garantam homogeneidade de resultados e evidências baseados em protocolos de uso comuns para geração de dados confiáveis. Estes consensos científicos, dedicam-se à otimização de componentes fundamentais de testes de citometria de fluxo. Seu objetivo é identificar as principais áreas de variabilidade, determinar os componentes críticos que necessitam de padronização, desenvolver e definir padrões e critérios de aceitabilidade e fornecer orientações e medidas para implementação prática no laboratório.

Um exemplo, é o Grupo Brasileiro de Citometria de Fluxo (GBCFLUX), que é composto por especialistas da área de citometria de fluxo (CF) que possuem o objetivo comum de contribuir para avanços técnico-científicos em laboratórios clínicos e de pesquisa brasileiros. O GBCFLUX é composto por comitês de trabalho e, entre eles, o subcomitê de controle de qualidade (CQ) de citometria de fluxo (FC), responsável por revisar os dados da literatura, discutir e propor recomendações que garantam a confiabilidade dos resultados e minimizem potenciais falhas técnicas, inerente ao método. O subcomitê determinou que um consenso de recomendações técnicas e científicas sobre CQ deveria ser elaborado e divulgado a todos os grupos de trabalho de CF no Brasil.

### **Quais processos de qualidade técnica permitem a harmonização dos parâmetros de leitura para ensaios de fluorescência multicoloridas**

Uma consideração ao se realizar ensaios de fluorescência multicolorida é a possibilidade de sobreposição espectral (*overlap*) entre fluoróforos. Como os fluoróforos usados na Citometria de Fluxo emitem fótons de múltiplas energias e comprimentos de onda, um método matemático chamado de compensação foi desenvolvido para que se possa identificar a medição dos fótons de um fluoróforo nos vários detectores, separando cada faixa de fluorescência específica detectada de cada fluoróforo nos diferentes detectores. Devido à natureza das medições de Citometria de Fluxo, a emissão de uma partícula é medida não em um único detector, mas em todos os detectores usados no experimento. Por exemplo, o FITC emite fótons verdes, amarelos e laranja, todos os quais podem ser detectados num equipamento com múltiplos detectores. Em alguns experimentos, o FITC (isotiocianato de fluoresceína) pode ser combinado com outros fluoróforos, como por exemplo PE (ficoeritrina), que emite fótons amarelos e laranja. Nesses casos, a contribuição relativa de cada fluoróforo para o sinal em um determinado detector deve ser especificamente determinada e descontados os sinais sobrepostos.

A titulação de anticorpos é também um processo importante que garante a geração de um gráfico de intensidade média de fluorescência (MIF) contra a concentração de um anticorpo, para a otimização do processo de marcação de células. O objetivo deste procedimento é obter a melhor resolução, do volume de anticorpos, que gere uma separação efetiva entre populações positivas e negativas para aquele determinado marcador.

Para que a compensação seja realizada com êxito, recomenda-se a utilização de amostras de células marcadas individualmente com cada fluoróforo que será utilizado na análise. Estas amostras, denominadas de controles de compensação, devem ser adquiridas antes das amostras experimentais marcadas com múltiplos fluoróforos. Através destas marcações simples, é possível ajustar o percentual de marcação somente para uma determinada fluorescência, traçando uma linha imaginária na mediana dos eventos negativos e positivos, de forma que os mesmos devam estar alinhados. Este processo pode ser realizado manualmente pelo operador ou de forma automática pelos softwares encontrados nos citômetros mais modernos. Após a compensação de cada fluoróforo, as amostras podem ser então adquiridas e analisadas sem que haja sobreposições de sinais de fluorescência. Recentemente o uso de *beads* (esferas) de compensação, que são vendidas pelas empresas que fornecem os insumos, tem facilitado também o processo de harmonização de captação de fluorescência. As esferas de compensação capturam anticorpos específicos da espécie conjugados com fluoróforos e outros tipos de reagentes. O objetivo dessas esferas é definir tensões e parâmetros de ativação para obter um sinal de fluorescência preciso.

## **QUESITOS AVALIADOS**

### **QUESITO 2.1- Princípios metodológicos da citometria**

Conceito 0 – Não abordou o quesito.

Conceito 1 – Mencionou, de forma precária, os princípios metodológicos da citometria de fluxo, sem desenvolver o aspecto, ou o fez de forma totalmente equivocada.

Conceito 2 – Apresentou os princípios metodológicos, mas sem aprofundar conceitos e sem apresentar a principal importância na prática clínica.

Conceito 3 – Apresentou os princípios metodológicos da citometria de fluxo de forma clara e com bom desenvolvimento, e de que forma a tornam uma ferramenta de grande importância na prática clínica dos laboratórios.

### **QUESITO 2.2 - Surgimento dos consensos científicos**

Conceito 0 – Não abordou o quesito.

Conceito 1 – Mencionou o quesito, mas não o desenvolveu.

Conceito 2 – Abordou o quesito, mas sem citar aspectos de importância dos consensos científicos que viabilizam a padronização e harmonização em diferentes laboratórios.

Conceito 3 – Abordou o quesito de forma clara e com bom desenvolvimento, citando os aspectos de importância dos consensos científicos que viabilizam a padronização e harmonização em diferentes laboratórios.

### **QUESITO 2.3 - Processos de qualidade técnica**

Conceito 0 – Não abordou nenhum aspecto dos processos de qualidade técnica para harmonização dos ensaios de fluorescência multicoloridas.

Conceito 1 – Mencionou o quesito, mas não o desenvolveu.

Conceito 2 – Desenvolveu o quesito de forma parcialmente adequada, com texto desconectado ou incoerente com a abordagem dos demais aspectos.

Conceito 3 – Desenvolveu adequadamente o quesito, apresentando os processos de qualidade técnica permitem a harmonização dos parâmetros de leitura para ensaios de fluorescência multicoloridas

# INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA (INPA)

## CARGO 60: TECNOLOGISTA PLENO 2 – ESPECIALIDADE: T10 ÁREA DE ATUAÇÃO: CITOMETRIA DE FLUXO E IMUNOFENOTIPAGEM

### Prova Discursiva – Questão 2

Aplicação: 24/03/2024

## PADRÃO DE RESPOSTA DEFINITIVO

O(A) candidato(a) deve abordar sobre o princípio da técnica do CBA para detecção de citocinas livres, que é desenvolvida para a detecção de citocinas usando *beads* (microesferas) acopladas a fluorocromos e analisadas por citometria de fluxo. Seis populações de *beads* com distintas intensidades de fluorescência são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina. Em seguida, as *beads* conjugadas com os anticorpos de captura são incubadas com as amostras de interesse e, posteriormente, misturadas com o anticorpo de detecção, conjugado com o fluorocromo ficoeritrina (PE), para formar o ensaio em sanduíche (bead-anticorpo de captura + citocina + anticorpo de detecção). Por fim, as amostras são analisadas por citometria de fluxo. Os principais tipos de amostras em que são detectadas as citocinas solúveis, são: sobrenadantes de cultura de tecidos e/ou células, plasma e/ou soro do sangue.

O(A) candidato(a) deve indicar que tanto nas *beads* quanto no anticorpo secundário, também chamado de anticorpo de detecção, possuem fluoróforos que serão detectados pelo citômetro de fluxo. Aqui o candidato também deve demonstrar que as *beads* comercialmente disponíveis usualmente possuem fluorescência intrínseca e podem variar em tamanho e intensidade de fluorescência. Esta variabilidade de características possibilita a personalização do painel analítico permitindo uma análise multiparamétrica, conhecida como multiplex.

Os dados são gerados em formato de gráfico (*dotplot* ou histograma). Como o sistema é revelado através do uso de anticorpos conjugados com fluoróforos específicos para o analito, formando uma espécie de sanduíche. Quanto maior a ligação do anticorpo conjugado, maior a concentração do analito e maior o sinal emitido pelo equipamento. A curva tem uma variação de concentração de 0 a 5000 pg mL<sup>-1</sup> e à medida que as concentrações vão aumentando, as *beads* vão se deslocando para a direita (representativo do aumento da intensidade do sinal no histograma).

### QUESITOS AVALIADOS

#### QUESITO 2.1 Desenvolvimento sobre o princípio da técnica do CBA

Conceito 0 – Não abordou o quesito.

Conceito 1 – Abordou o fundamento da técnica de forma vaga, sem citar componentes (*beads*, anticorpos de captura e de detecção/secundário) e nem o tipo de ensaio final envolvendo as citocinas livres.

Conceito 2 – Abordou o fundamento da técnica, sem citar todos os principais componentes (*beads*, anticorpos de captura e de detecção/secundário) e não mencionou o tipo de ensaio final envolvendo as citocinas livres.

Conceito 3 – Abordou o fundamento da técnica de forma clara, citando os principais componentes (*beads*, anticorpos de captura e de detecção/secundário), mas sem mencionar o tipo de ensaio final envolvendo as citocinas livres.

Conceito 4 – Abordou o fundamento da técnica de forma clara e com bom desenvolvimento, citando os principais componentes (*beads*, anticorpos de captura e de detecção/secundário) e mencionando tipo de ensaio final envolvendo as citocinas livres.

#### QUESITO 2.2 Apresentação das principais amostras utilizadas para detecção de citocinas livres pela técnica do CBA

Conceito 0 – Não abordou o quesito.

Conceito 1 – Apresentou apenas um tipo de amostra utilizada para detecção de citocinas livres pela técnica do CBA.

Conceito 2 – Apresentou de forma clara com pelo menos dois principais tipos de amostras utilizadas para detecção de citocinas livres pela técnica do CBA.

#### QUESITO 2.3 Apresentação dos principais locais onde são encontrados fluoróforos na técnica do CBA

Conceito 0 – Não abordou o quesito.

Conceito 1 – Indicou a presença do fluoróforo apenas em um dos elementos: nas *beads* (microesfera) ou no anticorpo de detecção/secundário.

Conceito 2 – Indicou a presença do fluoróforo tanto nas *beads* (microesfera) quanto no anticorpo de detecção/secundário, mas sem mencionar a detecção multiplex.

Conceito 3 – Indicou a presença do fluoróforo tanto nas *beads* (microesfera) quanto no anticorpo de detecção/secundário, mas abordou de forma vaga a detecção multiplex.

Conceito 4 – Indicou a presença do fluoróforo de forma clara e completa mencionando tanto nas *beads* (microesfera) quanto no anticorpo de detecção/secundário, bem como as particularidades das *beads* para detecção multiplex, como; diferenças no tamanho/intensidade de fluorescência.

#### **QUESITO 2.4 Correlação entre detecção e quantificação da citocina**

Conceito 0 – Não abordou o quesito.

Conceito 1 – Abordou o tema de forma vaga, sem desenvolvê-lo não apontando indícios de que há correlação entre a intensidade de fluorescência e a concentração da citocina.

Conceito 2 – Abordou o tema, mencionando de forma vaga que há correlação entre a intensidade de fluorescência e a concentração da citocina, mas sem abordar que é necessário uma curva de calibração disponível nos *kits*.

Conceito 3 – Abordou o tema de forma clara, mencionando que há correlação entre a intensidade de fluorescência e a concentração da citocina, mas sem abordar que é necessário uma curva de calibração disponível nos *kits*.

Conceito 4 – Abordou o tema de forma clara e completa, mencionando que há correlação entre a intensidade de fluorescência e a concentração da citocina e indicando que é necessário uma curva de calibração disponibilizada nos *kits*.

# INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA (INPA)

## CARGO 60: TECNOLOGISTA PLENO 2 – ESPECIALIDADE: T10 ÁREA DE ATUAÇÃO: CITOMETRIA DE FLUXO E IMUNOFENOTIPAGEM

Prova Discursiva – Questão 3

Aplicação: 24/03/2024

### PADRÃO DE RESPOSTA DEFINITIVO

- Separação de populações específicas em amostras celulares heterogêneas e imunofenotipagem celular.
- Marcação de antígenos de superfície.

Para a identificação de células T CD4 humanas deve-se usar a população 1 (*gate* ou janela selecionada número 1), já que tem tamanho (*Forward scatter* ou FSC) e granulosidade (*Side scatter* ou SSC) compatível com a população de células linfóides viáveis detectadas no sangue. A partir desta população, deve ser selecionada uma população excluindo os dupletes (*doublets*). A população de células selecionada pode ser utilizada para identificação das células T CD4 como as células duplo-positivas marcadas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD4 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) humanos. O percentual de células sanguíneas duplo-positivas CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> dos indivíduos infectados será comparado ao percentual obtido de indivíduos controles. **É possível também utilizar o marcador para células T CD8 (anticorpo anti-CD8 humano) para identificar a população de células T CD4 como células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>.**

#### QUESITOS AVALIADOS

##### QUESITO 2.1- Identificação de uma população de células linfóides

Conceito 0 – Não abordou o quesito ou fez de forma completamente equivocada.

Conceito 1 – Mencionou os tópicos do quesito, mas não desenvolveu nenhum.

Conceito 2 – Desenvolveu corretamente apenas um tópico do quesito.

Conceito 3 – Desenvolveu corretamente todos os tópicos indicados de forma adequada.

##### QUESITO 2.2 - Identificação dos principais anticorpos usados

Conceito 0 – Não abordou o quesito ou fez de forma completamente equivocada.

Conceito 1 – Mencionou os tópicos do quesito, mas não desenvolveu nenhum.

Conceito 2 – Desenvolveu corretamente apenas um tópico do quesito.

Conceito 3 – Desenvolveu corretamente todos os tópicos indicados de forma adequada.

##### QUESITO 2.3 - Identificação da necessidade da exclusão de células dupletes

Conceito 0 – Não abordou o quesito ou fez de forma completamente equivocada.

Conceito 1 – Mencionou o tópico do quesito, mas não desenvolveu.

Conceito 3 – Desenvolveu corretamente o tópico indicado de forma adequada.

# INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA (INPA)

## CARGO 60: TECNOLOGISTA PLENO 2 – ESPECIALIDADE: T10 ÁREA DE ATUAÇÃO: CITOMETRIA DE FLUXO E IMUNOFENOTIPAGEM

### Prova Discursiva – Questão 4

Aplicação: 24/03/2024

## PADRÃO DE RESPOSTA DEFINITIVO

Os processos citados na questão e que fazem parte do dogma central são a transcrição, na qual ocorre a síntese do RNA a partir do DNA, e a tradução, na qual ocorre a síntese de proteínas a partir do RNA. O processo de transcrição ocorre no núcleo celular, enquanto o de tradução, no citoplasma.

A transcrição acontece a partir da atividade da enzima RNA polimerase e é dividida em três etapas: iniciação, alongamento e término. Na iniciação ocorre o reconhecimento e a ligação da RNA polimerase ao promotor do gene a ser transcrito, seguido da quebra das ligações de hidrogênio (desnaturação) e da separação dos polinucleotídeos do DNA, formando-se a “bolha de transcrição”. No alongamento, um dos polinucleotídeos do DNA será utilizado como molde para o encadeamento de ribonucleotídeos pela RNA polimerase, respeitado o pareamento de bases entre a sequência do DNA (fita molde) e a sequência do RNA que está sendo sintetizado. Ao final do processo, a RNA polimerase libera o RNA transcrito na etapa de término. O RNA transcrito passará por modificações (processamento) antes de seguir para o processo de tradução.

A tradução ocorre em três etapas: iniciação, alongamento e término. Nesse processo há a participação do mRNA, cuja sequência de códons é importante para determinar a sequência de aminoácidos do tRNA, que transporta os aminoácidos até o local da síntese e decodifica a sequência dos códons do mRNA e do rRNA, importante para a formação do ribossomo, estrutura em que ocorre o encadeamento dos aminoácidos. Na primeira etapa, ocorre a formação do complexo de iniciação da tradução, em que as subunidades menor e maior do ribossomo se associam ao mRNA juntamente com tRNA iniciador, que carrega o primeiro aminoácido. A partir da formação desse complexo, ocorre a etapa de alongamento, na qual acontecem a leitura dos códons do mRNA e o encadeamento dos aminoácidos. Nessa etapa, o tRNA iniciador localiza-se no sítio P do ribossomo, enquanto o sítio A encontra-se inicialmente vazio. O tRNA que carrega o próximo aminoácido ocupa o sítio A do ribossomo, de acordo com o códon que está nesse sítio. Uma ligação peptídica é formada entre os aminoácidos, seguida da translocação do ribossomo para a leitura do próximo códon. Essa sequência de eventos da etapa de alongamento se repete até a entrada de um códon finalizador no sítio A, o que resulta na dissociação do complexo de tradução e liberação do peptídeo sintetizado, caracterizando-se a etapa de término da tradução.

### QUESITOS AVALIADOS

#### QUESITO 2.1

Conceito 0 – Não abordou corretamente nenhum aspecto do quesito.

Conceito 1 – Apenas citou os nomes dos processos.

Conceito 2 – Citou os nomes dos dois processos, porém definiu corretamente apenas um deles, sem explicar onde ocorre.

Conceito 3 – Citou e definiu corretamente os dois processos, mas não explicou onde ocorrem.

Conceito 4 – Citou e definiu corretamente os dois processos, mas só explicou onde um deles ocorre.

Conceito 5 – Citou e definiu os dois processos, explicando onde ocorrem.

#### QUESITO 2.2

Conceito 0 – Não descreveu nenhuma das etapas do processo de transcrição.

Conceito 1 – Mencionou etapas do processo de transcrição, mas não as detalhou adequadamente.

Conceito 2 – Detalhou apenas parte das etapas do processo de transcrição, cometendo equívocos.

Conceito 3 – Detalhou todas as etapas do processo de transcrição, mas cometeu algum equívoco na descrição.

Conceito 4 – Detalhou todas as etapas do processo de transcrição, de forma totalmente correta.

#### QUESITO 2.3

Conceito 0 – Não abordou o quesito.

Conceito 1 – Mencionou o quesito, mas não o desenvolveu.

Conceito 2 – Desenvolveu o quesito de forma parcialmente correta.

Conceito 3 – Desenvolveu o quesito corretamente.

**QUESITO 2.4**

Conceito 0 – Não abordou o papel do mRNA, do tRNA nem do rRNA.

Conceito 1 – Abordou corretamente o papel apenas do mRNA, do tRNA ou do rRNA.

Conceito 2 – Abordou corretamente apenas os papéis do mRNA, do tRNA e(ou) do rRNA.

Conceito 3 – Abordou corretamente os papéis do mRNA, do tRNA e do rRNA.

**QUESITO 2.5**

Conceito 0 – Não descreveu nenhuma das etapas do processo de tradução.

Conceito 1 – Mencionou etapas do processo de tradução, mas não as detalhou adequadamente.

Conceito 2 – Detalhou apenas parte das etapas do processo de tradução, cometendo equívocos.

Conceito 3 – Detalhou todas as etapas do processo de tradução, mas cometeu algum equívoco na descrição.

Conceito 4 – Detalhou todas as etapas do processo de tradução, de forma totalmente correta.