

FIOCRUZ

# **Concurso Público Fiocruz 2023**

**Tecnologista em Saúde Pública**

**Prova Objetiva e Discursiva**

**TE55 - Plataforma tecnológica de  
caracterização de proteínas e  
citometria de fluxo**



## Prova Objetiva

**01.** Observe as afirmativas a seguir, em relação à Citometria de Fluxo.

- I. Trata-se de método rápido e objetivo que permite a determinação simultânea de múltiplos parâmetros de partículas isoladas em suspensão.
- II. Mede as propriedades de partículas em suspensão, orientadas num fluxo laminar e interceptadas uma a uma por um ou mais feixes de lasers.
- III. A luz dispersa é coletada por um sistema ótico que permite identificar células pelo seu tamanho e complexidade interna.

Sobre as afirmativas acima, pode-se dizer que:

- (A) apenas I está correta.
- (B) apenas II está correta.
- (C) apenas I e III estão corretas.
- (D) apenas II e III estão corretas.
- (E) todas estão corretas.

**02.** A Citometria de Fluxo emprega três importantes sistemas na aquisição de dados quantificáveis a partir de uma amostra. Um dos sistemas empregados é o sistema de fluidos. Em relação a este sistema, é INCORRETO afirmar que:

- (A) as partículas em suspensão são focalizadas hidrodinamicamente pela aspiração da amostra em um fluxo de fluido à medida que atravessa um orifício.
- (B) o foco hidrodinâmico induz as partículas em suspensão a ficarem enfileiradas, permitindo que a luz incida nelas de maneira individualizada.
- (C) em um instrumento tradicional, com foco hidrodinâmico, recomenda-se executar todas as aquisições de amostras na mesma velocidade de fluxo e com o mesmo volume de amostra.
- (D) bolhas na célula de fluxo nunca causam problemas na aquisição de dados.
- (E) à medida que a taxa de eventos aumenta, também aumenta a taxa de abortos, levando a possibilidade de perda de eventos raros.

**03.** Conhecer a configuração ótica dos citômetros de fluxo disponíveis na plataforma é importante por algumas razões, EXCETO:

- (A) para apenas a equipe da plataforma.
- (B) pois contribui para a elaboração de experimentos.
- (C) pois auxilia na tomada de decisão de qual instrumento utilizar.
- (D) para selecionar quais fluorocromos podem ser empregados.
- (E) porque é fundamental para definição do número de marcadores a serem avaliados.

**04.** Em relação a fluorocromos e corantes empregados em Citometria de Fluxo, avalie se as afirmativas a seguir são verdadeiras (V) ou falsas (F).

- I. Um determinado fluorocromo pode ser excitado apenas uma vez e depois é irreparavelmente fotobranqueado.
- II. Para armazenamento a longo prazo, os fluorocromos, tipo "Tandem", devem ser expostos à luz e congelados.
- III. A autofluorescência é excitada apenas pelos lasers violeta e azul e emitida nos comprimentos de onda azul, verde e amarelo.
- IV. O substrato fluorescente, denominado éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (do inglês, carboxylfluorescein succinimidyl ester - CFSE), é um exemplo de corante de ácido nucleico, que pode ser empregado para determinar divisão celular ou viabilidade celular.
- V. Os corantes de viabilidade celular associam-se sempre ao DNA.

De cima para baixo, a sequência correta é:

- (A) V, F, V, V e F.
- (B) F, V, V, F e F.
- (C) F, V, V, V e F.
- (D) V, F, F, V e F.
- (E) V, V, F, V e V.

**05.** A titulação de anticorpos é fundamental para garantir que a fluorescência detectada seja específica, minimizando a superestimação ou subestimação dos sinais e obtendo resultados mais precisos. Neste sentido, a variável que influencia neste processo é:

- (A) o tempo de incubação.
- (B) a concentração do anticorpo.
- (C) o volume do anticorpo.
- (D) a temperatura.
- (E) o custo do anticorpo.

**06.** A respeito das bases da compensação das fluorescências segundo os princípios metodológicos da Citometria de Fluxo, é correto afirmar que:

- (A) controle de isotipo sempre é necessário para a compensação das fluorescências.
- (B) marcador de viabilidade celular deve ser adicionado às microesferas de compensação de fluorescências.
- (C) uso de fluorocromo para compensação diferente daquele utilizado na amostra é aceitável, desde que a emissão de fluorescência de ambos os fluorocromos seja detectada pelo mesmo filtro de fluorescência.
- (D) microesfera de compensação de fluorescências dos ensaios deve ser a mesma microesfera de calibração diária dos equipamentos.
- (E) controles de compensação devem ser sempre tão ou mais brilhantes do que a amostra.

**07.** A calibração diária do citômetro de fluxo, empregando microesferas fluorescentes mensura, EXCETO:

- (A) desvio padrão ao quadrado da população de células não marcadas.
- (B) eficiência de detecção de fluorescência relativa.
- (C) linearidade dos tubos fotomultiplicadores (do inglês, photomultiplier tubes - PMTs).
- (D) desvio padrão do ruído eletrônico.
- (E) atraso de tempo de acionamento do laser (do inglês, Time Delay).

**08.** A característica da fluorescência impactada pelo aumento do ruído eletrônico de um citômetro de fluxo é:

- (A) a própria escolha.
- (B) o tipo.
- (C) a intensidade.
- (D) a voltagem.
- (E) a resolução.

**09.** O atraso do tempo de acionamento do laser (do inglês, Time Delay) é importante para:

- (A) planejar quanto tempo levará a aquisição do ensaio.
- (B) corrigir o tempo para as células serem interceptadas pelos lasers.
- (C) adequar a concentração da amostra.
- (D) ajustar a velocidade de fluxo do citômetro.
- (E) evitar a formação de bolhas na célula de fluxo do citômetro.

**10.** Em painéis multiparamétricos, um tipo de controle que não é mais empregado, EXCETO para identificar bloqueio ineficiente de reatividade inespecífica é o controle:

- (A) tipo Fluorescência menos 1 (do inglês, Fluorescence Minus One Control - FMO).
- (B) de compensação.
- (C) isotópico.
- (D) proposto na bula do fabricante.
- (E) de células não marcadas.

**11.** A tomada de decisão para a escolha dos fluorocromos em um painel multiparamétrico, envolve:

- (A) escolher o fluorocromo que está disponível para uso no laboratório.
- (B) empregar o mesmo fluorocromo citado em um artigo de referência.
- (C) utilizar qualquer fluorocromo que esteja disponível na plataforma de citometria.
- (D) escolher o fluorocromo independente da configuração do citômetro de fluxo.
- (E) selecionar o fluorocromo de acordo com a configuração do citômetro de fluxo e do tipo celular que será investigado.

**12.** As afirmativas abaixo são regras práticas adequadas ao escolher a combinação de fluorocromos de um painel multiparamétrico, EXCETO:

- (A) intensidade de fluorescência do fluorocromo baixa e densidade antigênica baixa.
- (B) intensidade de fluorescência do fluorocromo alta e densidade antigênica baixa.
- (C) intensidade de fluorescência do fluorocromo baixa e densidade antigênica alta.
- (D) intensidade de fluorescência do fluorocromo alta e densidade antigênica alta.
- (E) intensidade de fluorescência do fluorocromo alta e densidade antigênica intermediária.

**13.** Um marcador de viabilidade deve ser empregado na seguinte situação, EXCETO:

- (A) presença de alto percentual de células mortas.
- (B) o citometrista desconhece o tipo celular da amostra.
- (C) o citometrista está tentando identificar eventos raros.
- (D) após descongelamento de células.
- (E) para quantificar as microesferas de compensação.

**14.** São aplicações clínicas da Citometria de Fluxo:

- I. Análise de reticulócitos.
- II. Diagnóstico e acompanhamento de leucemias e linfomas.
- III. Monitoramento de células CD4+ de pacientes HIV+.

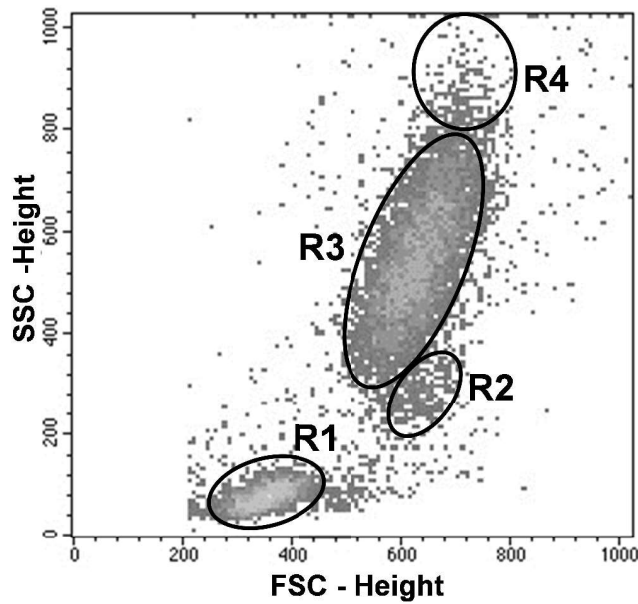
Das afirmativas acima:

- (A) V, V e F.
- (B) F, F e V.
- (C) V, V e V.
- (D) V, F e V.
- (E) F, F e F.

15. Observe a figura abaixo sobre o perfil morfométrico de células do sangue periférico humano avaliado por Citometria de Fluxo em gráfico bidimensional de densidade de tamanho (FSC-Height) versus complexidade interna (SSC-Height):

As populações celulares selecionadas nos gates R1, R2, R3 e R4 correspondem, respectivamente, a:

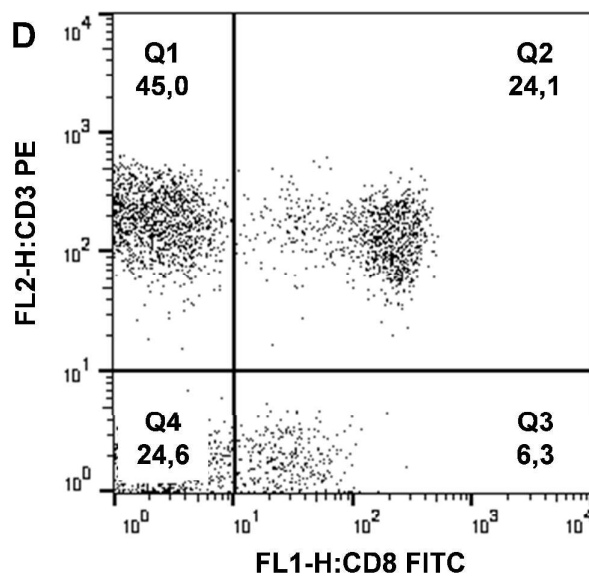
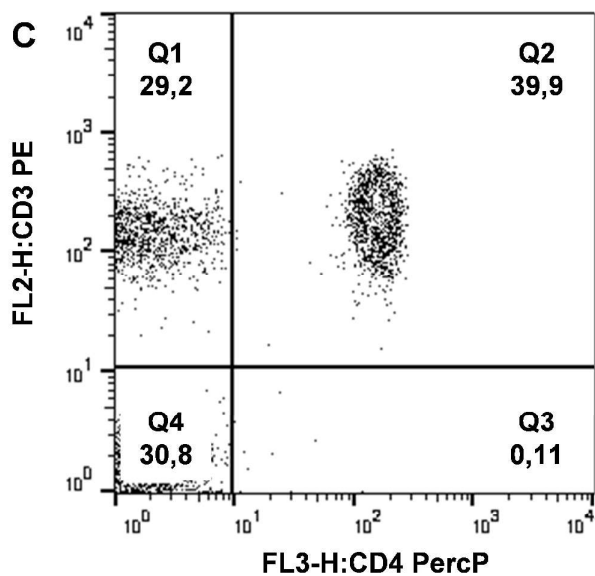
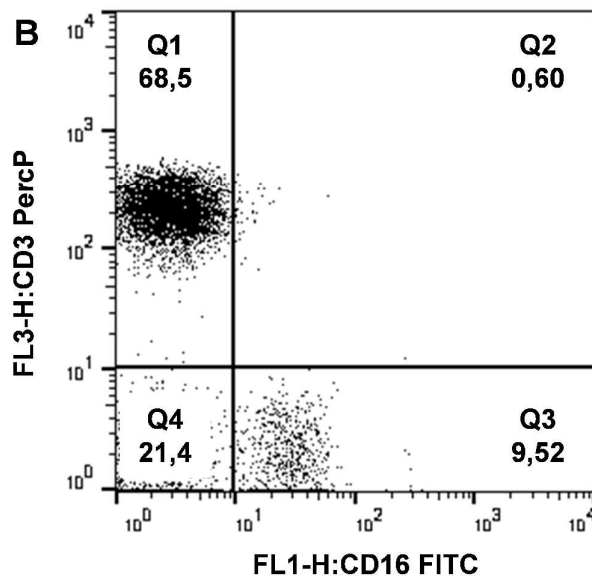
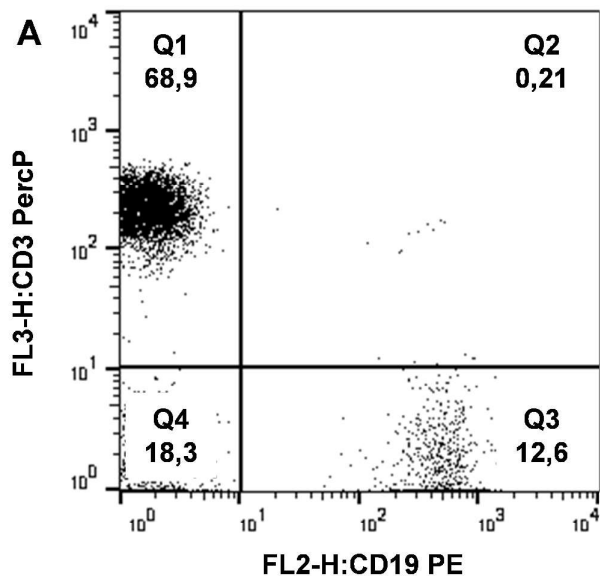
- (A) linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos.
- (B) neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos.
- (C) monócitos, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos.
- (D) eosinófilos, monócitos, neutrófilos e linfócitos.
- (E) linfócitos, monócitos, eosinófilos e granulócitos.



16. Considerando a população R1 da questão anterior, avalie os gráficos A-D abaixo, após imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos do sangue periférico humano:

Os percentuais das subpopulações de linfócitos T totais, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, linfócitos B e células NK são os seguintes, respectivamente:

- (A) 78,6%, 39,9%, 24,1%, 12,6% e 9,52%.
- (B) 69,1%, 39,9%, 24,1%, 12,6% e 9,52%.
- (C) 78,6%, 24,1%, 39,9%, 0,21% e 0,60%.
- (D) 69,1%, 39,9%, 24,1%, 12,6% e 0,60%.
- (E) 78,0%, 24,1%, 39,9%, 0,21% e 0,60%.



A		B	
Q1=68,9%	Q2=0,21%	Q1= 68,5%	Q2=0,60%
Q3=12,6%	Q4=18,3%	Q3=9,52%	Q4=21,4%
C		D	
Q1=29,2%	Q2=39,9%	Q1=45,0%	Q2=24,1%
Q3=0,11%	Q4=30,8%	Q3=24,6%	Q4=6,3%

17. A atenuação de ligações não específicas de anticorpos deve ser realizada, empregando:

- (A) titulação dos anticorpos.
- (B) soluções bloqueadoras de receptores Fc.
- (C) marcadores de viabilidade.
- (D) compensação com microesferas sem fluorescência.
- (E) compensação com microesferas com fluorescência.

18. O formato recomendado para exportar os arquivos eletrônicos de um citômetro de fluxo digital para um software de análises multiparamétricas é:

- (A) XLS DB backup.
- (B) Experimental Template.
- (C) FCS 3.3.
- (D) FCS 3.0.
- (E) FCS XLS 3.0.

19. Os fluorocromos são moléculas fluorescentes geralmente acopladas a anticorpos com afinidade por determinada molécula de interesse. Observe as afirmativas abaixo sobre os fluorocromos empregados em Citometria de Fluxo.

- I. Absorvem a luz e emitem-na no mesmo comprimento de onda.
- II. Os mais brilhantes devem ser usados para detecção de marcadores de menor expressão.
- III. APC-Cy7 e PE-Cy7 (fluorocromos tipo "Tandem") podem degradar na presença de luz, após protocolo de fixação, temperaturas elevadas, podendo emitir sinais nos detectores primários correspondentes (APC e PE, respectivamente).

Das afirmativas acima:

- (A) apenas I está correta.
- (B) apenas II está correta.
- (C) apenas II e III estão corretas.
- (D) apenas I e II estão corretas.
- (E) todas estão corretas.

20. São aplicações rotineiras de separação de populações (cell sorting), EXCETO:

- (A) análise de expressão gênica.
- (B) análise do ciclo celular.
- (C) imunofenotipagem de populações específicas.
- (D) análise de citocinas e quimiocinas.
- (E) análise proteômica.

21. Uma série de métodos são utilizados para separação e purificação de proteínas. Entre os métodos abaixo, aquele que NÃO consiste em um método de separação e purificação de proteínas corresponde à(ao):

- (A) cromatografia.
- (B) eletroforese.
- (C) cristalização.
- (D) precipitação térmica.
- (E) ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

22. As técnicas de HPLC (cromatografia líquida de alta performance, do inglês *high-performance liquid chromatography*) e FPLC (cromatografia líquida de proteína rápida, do inglês *fast protein liquid chromatography*) têm sido utilizadas na separação e análise de proteínas. Dentre as alternativas abaixo, é INCORRETO afirmar que:

- (A) HPLC e FPLC são, ambas, técnicas analíticas.
- (B) a fase estacionária para FPLC é usualmente composta por microesferas de agarose, enquanto para HPLC é usualmente composta por grânulos de sílica.
- (C) é possível utilizar cromatografia de fase reversa em FPLC para purificação de proteínas e peptídeos hidrofóbicos.
- (D) FPLC opera com taxas de fluxo mais altas que HPLC.
- (E) as colunas utilizadas em FPLC suportam pressão máxima de 2-4 MPa, enquanto as colunas utilizadas em HPLC suportam pressões mais altas.

23. João, Tecnologista da FioCruz PE, recebeu a demanda de realizar a aquisição do espectro de dicroísmo circular (do inglês *circular dichroism* – CD) da glicoproteína Gc do vírus Oropouche. Apesar de a referida proteína ter sido transportada nas condições adequadas para a sua conservação, João identificou a existência de precipitado sólido no interior do tubo contendo a proteína em questão no momento do recebimento da amostra na FioCruz PE. Visando a realização da medição do espectro de CD à temperatura ambiente, João precisará quantificar novamente a amostra de proteína recebida, a fim de ajustar a concentração da mesma para a concentração de trabalho (20 mM, micromolar). Para tanto, João deverá remover o precipitado sólido e medir a concentração da proteína recebida por espectrofotometria utilizando luz no comprimento de onda de 280 nm (nanômetros). De posse da sequência primária da proteína em questão (informada abaixo), João rapidamente calculou o coeficiente de absorção molar ( $\epsilon$ ) da mesma.

Sequência de aminoácidos da glicoproteína Gc:

DEDCLSKDIKITYQELHNCIGPKIMGNTCVSKNELYSDF-SKLNVT EYDKKYFEPD TVNDQFNKIEFAQDAHRMILLERILYKTECEMLSLKKN SGPYNVAWR TYLKNHNIDLC SRH-NYKMICQCINTHSMCKNTDIDYNKEIETYYKSNAAYRADLNTIMDTLKTAFRGLTKVLIENYIEKDDSDALKALFS-NITDSVQDNYQMIGILKFASKLLDINLGGWSHPQFEK

O valor do coeficiente de absorção molar encontrado por João corresponde a:

- (A) 47325
- (B) 45360
- (C) 42864
- (D) 32860
- (E) 97325

**24.** A mensuração da concentração de uma determinada solução contendo proteína é frequentemente realizada por espectrofotometria de luz UV (ultravioleta) visível. Neste sentido, a absorção de luz UV é associada às transições eletrônicas nas quais os elétrons de determinadas moléculas absorvem energia em forma de luz e transitam para seus estados eletrônicos excitados (de maior energia). Neste contexto, o grupo de átomos em uma determinada molécula que compreende os orbitais envolvidos nas transições eletrônicas constituem os cromóforos. Dentre os cromóforos mais utilizados para mensuração da concentração de proteínas está o triptofano, cujo grupo indol (presente em seu anel aromático) absorve luz UV em torno de 280 nm (nanômetros) e sofre transição eletrônica neste comprimento de onda. Diante da necessidade de medir a concentração de determinada solução contendo uma proteína que não possua em sua sequência primária nenhum resíduo de triptofano, o aminoácido e o respectivo comprimento de onda de absorção de luz UV que deverá ser utilizado corresponde a:

- (A) fenilalanina, 257-270 nm.
- (B) fenilalanina, 247-272 nm.
- (C) histidina, 220-247 nm.
- (D) histidina, 222-257 nm.
- (E) tirosina, 210-226 nm.

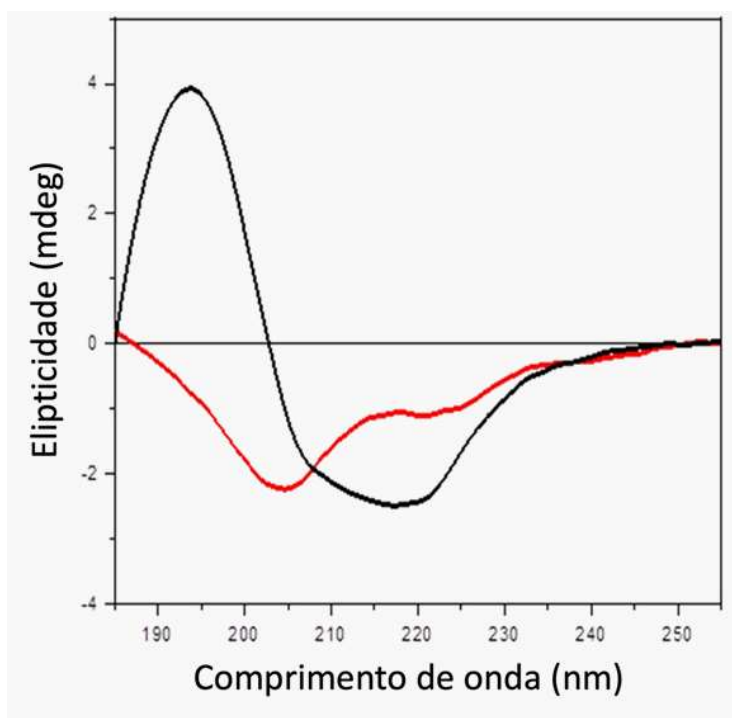
**25.** Sobre o método de Bradford para mensuração da concentração de uma solução contendo proteína, é INCORRETO afirmar que:

- (A) o princípio do método de Bradford é a ligação da forma catiônica do corante Azul de Coomassie G-250 às proteínas.
- (B) em pH neutro, o corante Azul de Coomassie G-250 possui carga elétrica global de -1.
- (C) as formas vermelha, verde e azul do corante absorvem radiação visível com absorção máxima a 470, 650 e 590 nm (nanômetros), respectivamente.
- (D) absorção de luz pela amostra é monitorada a 595 nm para maximizar absorbância do completo corante-proteína e minimizar a contribuição da forma verde do corante livre.
- (E) o corante Azul de Coomassie G250 pode existir em 3 diferentes estados de ionização.

**26.** A absorção de luz UV (ultravioleta) por proteínas tem sido analisada em detalhes e proposta como comprovação de manutenção estrutural desde os tempos iniciais da biologia molecular, conforme artigo publicado por D.B. Wetlaufer em 1962 na revista *Advances in Protein Chemistry*. A absorção de luz por proteínas neste intervalo espectral decorre principalmente das transições eletrônicas de grupos peptídicos (em 170-220 nm, nanômetros), cadeias laterais de aminoácidos aromáticos (próximo à 280 nm) e grupos prostéticos, cofatores e substratos ou inibidores enzimáticos (no intervalo de luz UV visível, a depender do grupo em análise). Muito embora o espectro de dicroísmo circular de uma determinada proteína represente as contribuições aditivas de cada tipo de estrutura secundária, cada uma destas apresentará uma assinatura óptica quanto à absorção de luz circularmente polarizada. Com base nesta informação, os comprimentos de onda e as correspondentes transições eletrônicas referentes aos espectros de dicroísmo circular de cada tipo de estrutura secundária estão corretamente descritos em:

- (A) hélice-alfa: um pico positivo em 200 nm e dois picos negativos em 216 nm e 218 nm.
- (B) hélice-alfa: um pico positivo em 190-191 nm e dois picos negativos em 208 nm e 220 nm.
- (C) folha-beta: um pico positivo em 195-196 nm e um pico negativo em 216-218 nm.
- (D) folha-beta: um pico positivo em 192 nm e dois picos negativos em 208 nm e 222 nm.
- (E) estrutura aleatória (do inglês random coil): um pico positivo em 200 nm e um pico negativo em 218 nm.

27. O cristalino é composto principalmente por proteínas solúveis em água (do inglês *water soluble* – WS) altamente ordenadas e denominadas cristalinas. A agregação e a perda de solubilidade destas proteínas ocasionam desde a opacificação progressiva do cristalino até o surgimento de catarata. Embora esta seja uma doença bem conhecida, o mecanismo de agregação das proteínas WS no cristalino não é bem compreendido. Uma das causas reconhecidas de modificação de proteínas está relacionada à exposição à luz UV (ultravioleta). Por esta razão, o grupo de pesquisa liderado por Claudia Honisch (*Institute of Biomolecular Chemistry, Padova, Itália*) decidiu avaliar as propriedades espectroscópicas das proteínas WS e a sua estabilidade frente à irradiação UV por espectroscopia de dicroísmo circular. Para tanto, proteínas WS de origem animal foram utilizadas para a medição do espectro far-UV de dicroísmo circular antes (linha preta) e após (linha vermelha) exposição à luz UV-C (254 nm, nanômetros) durante 45 minutos, conforme figura abaixo.



**Legenda:** Espectro de dicroísmo circular (far-UV) de proteínas WS isoladas do cristalino de porcos antes (preto) e após (vermelho) exposição à luz UV-C. Proteínas WS foram diluídas à concentração de 0,09 mg/mL em 10 mM tampão fosfato, pH 7,2. Espectro adquirido em equipamento Jasco J-1500. Condições do experimento: resposta de 1 s, data pitch de 0,5 nm, largura de banda (*bandwidth*) de 1,0 nm, e cubeta com caminho ótico de 0,1 cm (200  $\mu$ L). Adaptado de Honisch et al. Application of Circular Dichroism and Fluorescence Spectroscopies To Assess Photostability of Water-Soluble Porcine Lens Proteins. ACS Omega. 2020. 5 (8), 4293-4301. DOI: 10.1021/acsomega.9b04234.

Com base nos dados obtidos por Dr. Honisch, é correto afirmar que:

- (A) o espectro de dicroísmo circular da proteína WS antes da exposição à luz UV-C é caracterizado pela presença de uma banda positiva em 195 nm e uma banda negativa em 216 nm, indicando uma estrutura predominantemente composta por hélices-alfa.
- (B) a substituição das bandas positiva (a 195 nm) e negativa (a 216 nm) por duas bandas negativas em 205 nm e 222 nm sugere a presença de estrutura predominantemente desordenada após a exposição à luz UV-C.
- (C) a substituição das bandas positiva (a 195 nm) e negativa (a 216 nm) por duas bandas negativas em 205 nm e 222 nm sugere a presença de estrutura predominantemente composta por folhas-beta após a exposição à luz UV-C.
- (D) embora os dados indiquem que a exposição à luz UV-C induza à modificação da composição de estrutura secundária da proteína WS, os achados só podem ser considerados conclusivos após experimentos adicionais de desnaturação térmica.
- (E) as condições de aquisição do espectro não são adequadas à análise pretendida.



28. A técnica de espectroscopia de dicroísmo circular (do inglês *circular dichroism* – CD) é um método rápido para avaliar a estrutura secundária, o enovelamento e as propriedades de interação de uma biomolécula. Sobre esta técnica, é INCORRETO afirmar que:

- (A) CD é frequentemente expresso em unidades de delta épsilon ( $\Delta\epsilon$ ), a diferença entre a absorvância de luz circularmente polarizada para a direita ( $E_R$ ) e para a esquerda ( $E_L$ ) por uma molécula assimétrica, ou em graus de elipticidade ( $\theta$ ).
- (B) a elipticidade ( $\theta$ ) é descrita como a tangente dos raios do menor para o maior eixo elíptico e está relacionada à  $\Delta\epsilon$  pela seguinte equação:  $\theta = \Delta\epsilon \cdot 3298/\lambda$ .
- (C) delta épsilon ( $\Delta\epsilon$ ) é a intensidade do CD normalizada pela concentração e pelo comprimento do caminho óptico ( $\Delta\epsilon = \Delta A/l \cdot c$ ) e é frequentemente expressa em  $\text{deg. cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ .
- (D) dicroísmo circular é definido como a absorção diferencial de luz não polarizada para a direita ( $E_R$ ) e para a esquerda ( $E_L$ ) por uma molécula assimétrica.
- (E) exemplos de aplicações de CD em pesquisa incluem a determinação da estrutura secundária, da termodinâmica de enovelamento e da constante de ligação entre duas moléculas.

29. Diferentes tipos de biosensores têm sido desenvolvidos para o estudo de interações entre macromoléculas biológicas. Experimentos de interação em superfícies, tipicamente, envolvem a imobilização de uma molécula (ligante) em uma superfície e o monitoramento da interação dessa com uma segunda molécula (analito) em solução. Neste sentido, o aumento da concentração do analito na superfície do biosensor leva à mudança do índice de refração próximo à superfície. Dois principais tipos de instrumentos foram desenvolvidos para medir essa mudança com alta sensibilidade: interferômetros e equipamentos de ressonância plasmônica de superfície (do inglês *surface plasmon resonance* – SPR). Sobre este último, é correto afirmar que:

- (A) o fenômeno de SPR ocorre quando luz monocromática polarizada é refletida em uma superfície com revestimento plástico na interface entre dois meios de índices de refração diferentes.
- (B) se luz é emitida sobre uma superfície entre dois meios transparentes de índices de refração diferentes, acima do ângulo crítico de incidência, ocorre reflexão parcial da luz.
- (C) a incidência de luz polarizada na interface entre dois meios condutores leva à produção de plasmons de superfície, os quais são oscilações coletivas de elétrons livres e compõem a base da técnica de SPR.
- (D) quando a luz é convertida no modo plasmon de superfície em uma superfície metálica, a luz propaga-se, mas gradualmente atenua-se devido às perdas devidas à absorção no metal. Essa atenuação depende da função dielétrica do metal e da frequência de oscilação do plasmon de superfície.
- (E) embora filmes de ouro proporcionem espectros de SPR mais acurados que filmes de prata, filmes de ouro tendem a ser mais instáveis quimicamente.

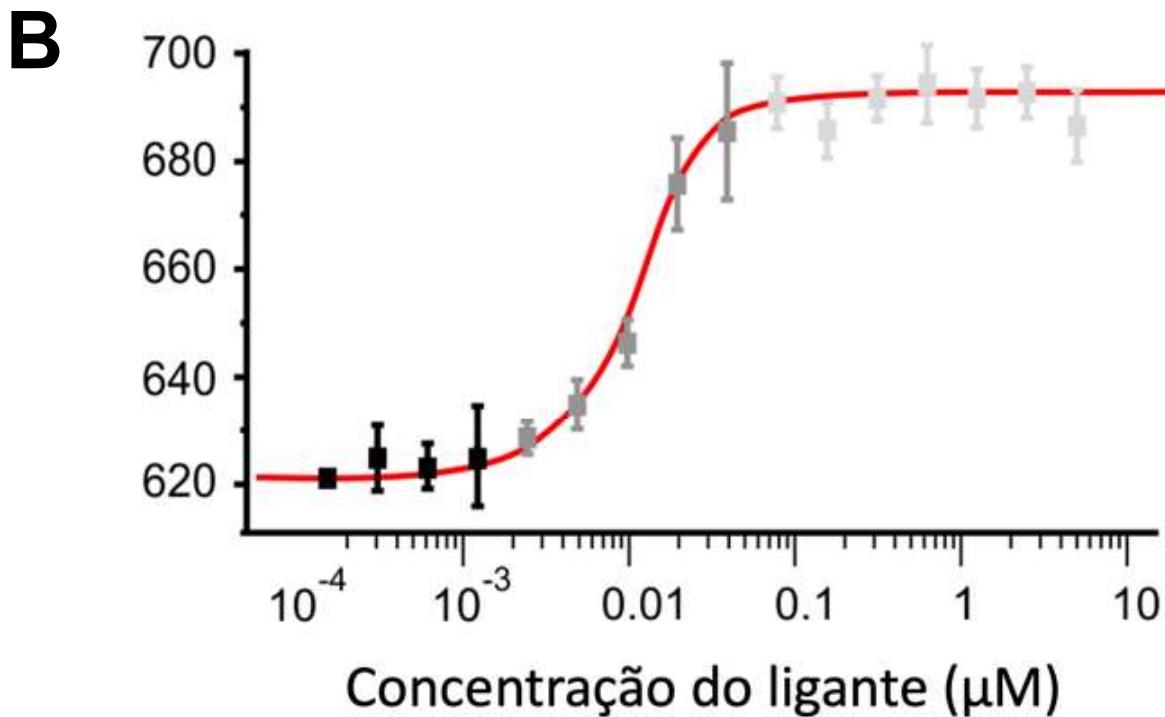
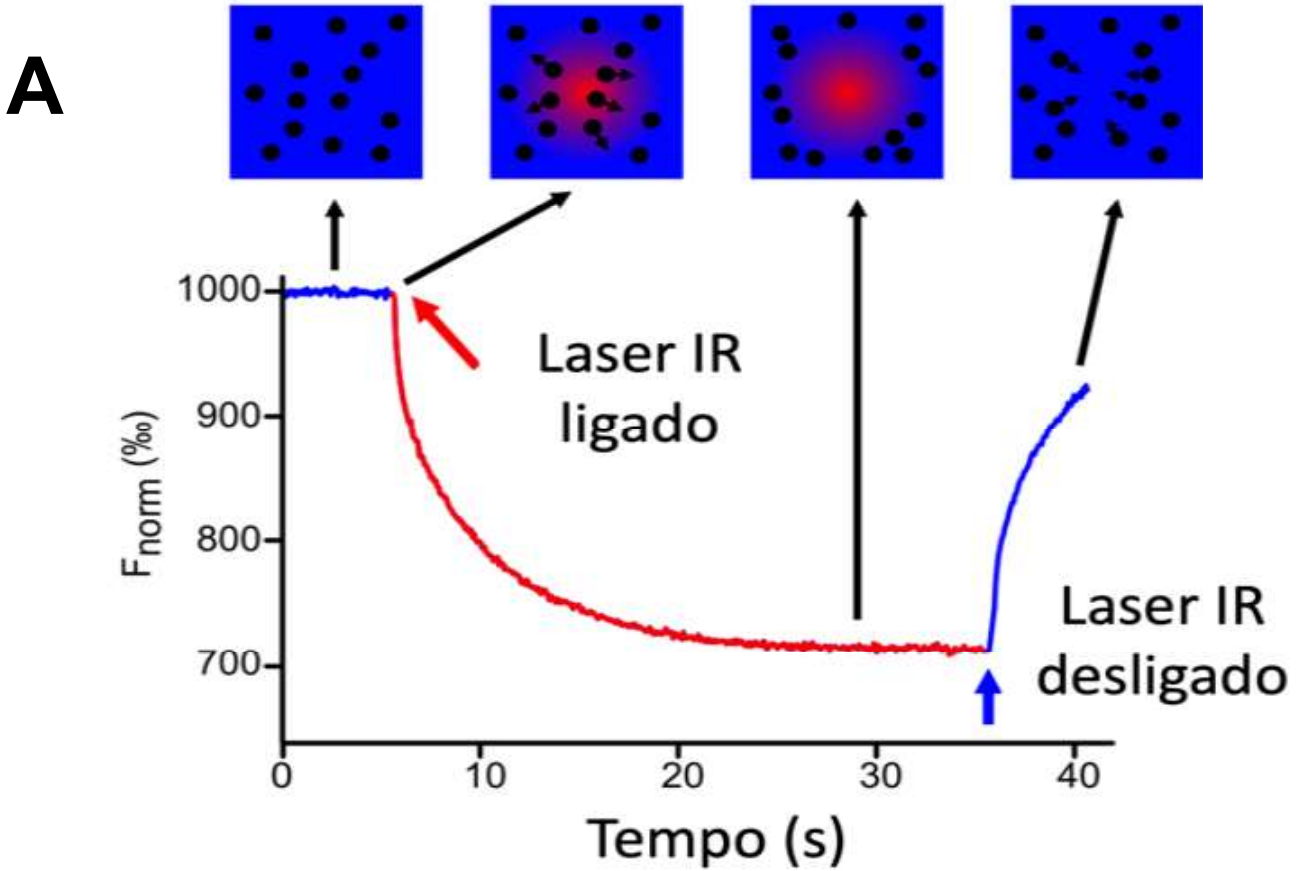
30. Joana, tecnóloga da Fiocruz PE, recebeu a demanda de determinar a constante de dissociação em equilíbrio termodinâmico ( $K_d$ ) decorrente da associação entre duas proteínas providas por grupo de pesquisa da própria instituição. Essas proteínas correspondem a uma proteína sintética de superfície de *Leishmania infantum* (com 30 kDa) e a um anticorpo monoclonal da classe IgG anti-*Leishmania* (adquirido comercialmente). Para atingir seu objetivo, Joana resolveu utilizar a técnica de ressonância plasmônica de superfície (do inglês *surface plasmon resonance* – SPR). Considerando a situação hipotética descrita, Joana deve:

- (A) escolher livremente se irá imobilizar a proteína sintética de *Leishmania infantum* ou o anticorpo IgG na superfície do sensor, pois essa escolha não afetará o valor de  $K_d$ .
- (B) imobilizar o anticorpo IgG no sensor com nível alvo de 50 RU (unidades de ressonância, do inglês *resonance units*) a fim de atingir a capacidade teórica máxima de ligação do analito ( $R_{\text{max}}$ ) de 20 RU.
- (C) imobilizar a proteína sintética de *Leishmania infantum* no sensor com nível alvo de 70 RU a fim de atingir  $R_{\text{max}}$  de 30 RU.
- (D) observar atentamente o sensorgrama e, caso este apresente padrão de associação linear, ela deverá aplicar o modelo isotérmico de Langmuir para calcular as constantes de associação ( $K_{\text{on}}$ ) e dissociação ( $K_{\text{off}}$ ).
- (E) reduzir o fluxo de injeção do analito e aumentar a densidade do ligante na superfície do sensor, caso ela observe limitação de transporte de massa.

31. Sobre os princípios biofísicos da termoforese em microescala, é correto afirmar que:

- (A) a técnica de termoforese em microescala baseia-se no efeito de Ludwig-Soret, de acordo com o qual moléculas submetidas a um gradiente de temperatura obrigatoriamente migram para as zonas mais frias do gradiente por difusão de massa.
- (B) o analito deverá estar associado a, ao menos, uma molécula luminescente para que o experimento de termoforese em microescala possa ser realizado.
- (C) o movimento termoforético de moléculas é monitorado por um sistema óptico que detecta a fluorescência extrínseca de um fluoróforo ou a fluorescência intrínseca do triptofano presente em proteínas e peptídeos.
- (D) um laser infravermelho com comprimento de onda de 1350 nm (nanômetros) é acoplado ao caminho óptico de excitação e emissão de fluorescência.
- (E) o experimento de termoforese em microescala requer que seja realizada uma curva de diluição do ligante associado à sonda fluorescente, a qual será posteriormente incubada com uma quantidade fixa do analito não fluorescente.

32. As figuras abaixo, (adaptadas de Jerabek-Willemsen et. al., J. Mol. Struct. 1077: 101-113, 2014), representam as etapas de um ensaio de termoforese em microescala (Figura A) e a curva dose-resposta como resultado do experimento (Figura B).



Baseado nas figuras acima apresentadas, é INCORRETO afirmar que:

- (A) na figura A, é possível observar que, no início do experimento, as moléculas estão distribuídas homogeneamente e uma fluorescência inicial constante é detectada.
- (B) na figura A, em torno de 30 segundos decorridos do experimento, as partículas encontram-se em um estado estacionário de equilíbrio dinâmico.
- (C) a migração termoforética ilustrada na figura A apresenta dependência direta do tamanho, carga e capacidade calorífica das partículas em análise.
- (D) a figura B ilustra uma curva de dose-resposta típica de uma equação de dois estados.
- (E) é possível calcular a constante de dissociação a partir da curva isoterma ilustrada na figura B.

33. A partir de um ensaio de termoforese em microescala, um estudante determinou que um anticorpo monoclonal reconhece seu antígeno com uma constante de dissociação ( $K_d$ ) de 1,0 nM. A energia livre ( $\Delta G$ ) de associação do complexo antígeno-anticorpo (expressa em kcal/mol) é: (Considere os seguintes dados:  $\ln 10^{-9} = 20,723$ ;  $R = 1,987$  cal/K.mol;  $T = 298$  K).

- (A) 12.270,62 kcal/mol
- (B) 28,57 kcal/mol
- (C) -12.270,62 kcal/mol
- (D) -12,27 kcal/mol
- (E) -28,57 kcal/mol

34. A quantificação de parâmetros cinéticos de interações proteína-proteína tem sido utilizada para o entendimento de diversos processos biológicos, tais como transdução celular, resposta imune, atividade enzimática etc. Entre as técnicas listadas abaixo, a única que NÃO é indicada para obtenção de parâmetros cinéticos corresponde a:

- (A) ressonância plasmônica de superfície.
- (B) interferometria de biocamada.
- (C) microscopia de força atômica.
- (D) calorimetria de titulação isotérmica.
- (E) termoforese em microescala.

35. Um pesquisador realizou um ensaio de ELISA no laboratório utilizando um anticorpo IgG comercial capaz de reconhecer um dado antígeno. O epítipo do antígeno é rico em resíduos de aminoácidos básicos, enquanto o parátipo do anticorpo é rico em resíduos de aminoácidos ácidos. A placa utilizada no experimento foi a placa de alta adesão de proteínas (também conhecida pelo termo em inglês *high binding*), a qual é composta por uma superfície de poliestireno funcionalizada com grupos carboxílicos. O pesquisador optou por imobilizar o antígeno na placa, pipetar o anticorpo e, em seguida, revelar o ensaio utilizando um anticorpo secundário marcado com peroxidase e dirigido à porção Fc do anticorpo primário. Todo o experimento ocorreu em  $\text{pH} = 7,4$ . O seguinte resultado é esperado deste experimento:

- (A) falso positivo.
- (B) falso negativo.
- (C) alta sensibilidade e baixa especificidade.
- (D) baixa sensibilidade e alta especificidade.
- (E) alta sensibilidade e especificidade.

36. Ensaio de luminescência e fluorescência de proteínas são técnicas valiosas em biologia molecular, bioquímica e biofísica. Essas técnicas são comumente utilizadas em ensaios baseados em placa, visto que este formato permite a triagem de alto rendimento de dezenas de condições experimentais ou de amostras devido à sua sensibilidade e à sua compatibilidade com leitores de microplacas. Contudo, técnicas baseadas em luminescência e em fluorescência diferem quanto aos mecanismos de detecção e aos tipos de sinal produzidos. Entre as alternativas abaixo, é INCORRETO afirmar que:

- (A) luminescência refere-se à emissão de luz que não envolve calor.
- (B) fluorescência envolve a absorção de luz em um comprimento de onda (excitação) e a subsequente emissão de luz em um comprimento de onda mais longo (emissão). Os ensaios medem a intensidade e o comprimento de onda da luz emitida.
- (C) na fluorescência, a luz é emitida por moléculas denominadas fluoróforos, e a absorção de fótons ocorre na região do infravermelho.
- (D) os ensaios luminescentes normalmente envolvem a detecção de luz produzida durante uma reação química.
- (E) os ensaios luminescentes são frequentemente mais sensíveis que os ensaios fluorescentes.

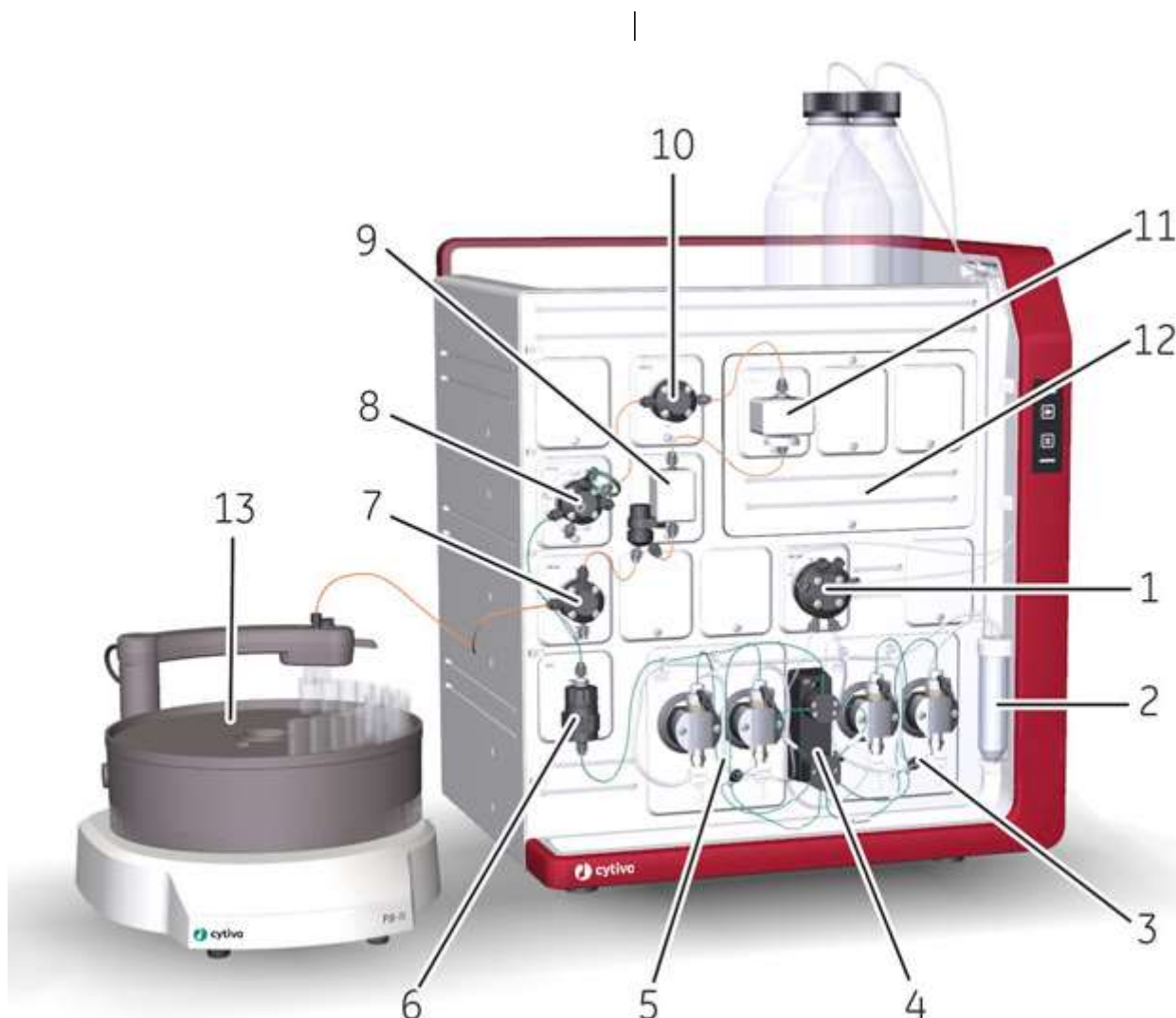
37. A espectroscopia de fluorescência em estado estacionário permite o monitoramento do espectro de emissão de proteínas em função do tempo, o qual pode revelar mudanças de intensidade de fluorescência. Tal técnica é útil para o estudo de mudanças conformacionais ou da cinética de ligação. A intensidade de fluorescência ( $I$ ) está relacionada à concentração do fluoróforo ( $C$ ) e à absorvidade molar ( $\epsilon$ ), pela equação  $I = \epsilon \cdot C \cdot L$ , conforme descrito pela lei de Lambert-Beer. Já o brilho de emissão ( $B$ ) é dado por  $B = \Phi \cdot \epsilon$ , onde  $\Phi$  é o rendimento quântico. Entre as afirmativas abaixo é INCORRETO afirmar que:

- (A) o espectro de emissão de fluorescência é um gráfico da intensidade de fluorescência em função do tempo. O pico de emissão corresponde ao comprimento de onda em que o fluoróforo emite mais luz.
- (B) a absorvidade molar, também conhecida como coeficiente de extinção molar, é uma medida de quanta luz uma molécula absorve em um determinado comprimento de onda.
- (C) o perfil de fluorescência de uma molécula pode depender do ambiente.
- (D) o rendimento quântico é uma razão entre a quantidade de luz emitida e a quantidade de luz absorvida.
- (E) a absorvidade molar é uma medida do quão fortemente um fluoróforo absorve luz em um comprimento de onda específico.

38. Espectroscopia de fluorescência intrínseca de proteínas é um procedimento amplamente utilizado para monitorar mudanças na estrutura terciária de proteínas. Esta técnica é dependente da presença de aminoácidos aromáticos, tais como fenilalanina, tirosina e triptofano. Sobre esta técnica, é INCORRETO afirmar que:

- (A) a fluorescência do triptofano é usada para monitorar mudanças estruturais na proteína, uma vez que seu comprimento de onda de emissão máxima é dependente da polaridade do ambiente.
- (B) resíduos de aminoácidos aromáticos sofrem transições  $p \rightarrow p^*$  quando excitados com luz em determinado comprimento de onda ( $I_{\text{emissão}}$ ) e liberam fótons, emitindo fluorescência.
- (C) o deslocamento bidirecional (do inglês *blue/red shift*) ocorre porque mudanças conformacionais em proteínas podem levar ao deslocamento do comprimento de onda de emissão máximo para comprimentos de onda maiores ou menores.
- (D) triptofanos exibem deslocamento vermelho (do inglês *red shift*,  $I_{\text{emissão}} > I_{\text{excitação}}$ ) à medida que a polaridade do solvente aumenta, ou seja, quando este cromóforo se move para um ambiente hidrofílico.
- (E) se o comprimento de onda de emissão máxima sofre um deslocamento azul (do inglês *blue shift*) ( $I_{\text{emissão}} < I_{\text{excitação}}$ ), é esperado que o fluoróforo encontre-se em ambiente mais hidrofílico.

39. Maria, tecnologista da Fiocruz PE, está desenvolvendo protocolos a serem distribuídos entre os usuários do sistema cromatográfico da instituição (conforme representado na figura abaixo). A respeito dos componentes do sistema em questão, é correto afirmar que:



- (A) o monitor de pressão corresponde ao item 6.
- (B) a válvula de entrada (do inglês *inlet valve*) corresponde ao item 8.
- (C) a válvula de coluna corresponde ao item 11.
- (D) a bomba A corresponde ao item 3.
- (E) o monitor de condutividade corresponde ao item 9.

40. A medida da absorvância é comumente usada para caracterizar interações proteína-proteína. Quando associada a métodos baseados em placas, fornece uma abordagem de alto rendimento para triagem de múltiplas interações simultaneamente. Entre os itens abaixo, o único com métodos que utilizam medidas de absorvância a partir de amostras em placas é:

- (A) dicroísmo circular, AlphaLISA, multiplex ELISA.
- (B) AlphaLISA, microarranjo de proteínas, ELISA.
- (C) dicroísmo circular, microarranjo de proteínas, multiplex ELISA.
- (D) termoforese em microescala, ressonância plasmônica de superfície, microarranjo de proteínas.
- (E) termoforese em microescala, microarranjo de proteínas, ELISA.

# Prova Discursiva

## QUESTÃO

O consultor técnico da Plataforma Tecnológica de Caracterização de Proteínas e Citometria de Fluxo recebeu a seguinte solicitação de serviço: realização de sorting de linfócitos T reguladores, a partir de linfócitos mononucleares do sangue periférico humano (do inglês, peripheral blood mononuclear cells - PBMC), visando: (I) sorter de linfócitos T reguladores; (II) caracterização proteômica dos linfócitos T reguladores pós-sorting e (III) análise da função reguladora, após a realização de cultivo celular in vitro dos linfócitos T reguladores pós-sorting. Os equipamentos disponíveis na Plataforma para realização do serviço são: 1) Espectrômetro de massas híbrido de alta resolução, contendo três analisadores de massas (quadrupolo, Orbitrap e Ion Trap), além do módulo de alta capacidade de fragmentação. O equipamento opera acoplado a um cromatógrafo líquido de alta eficiência ultrasensível (do inglês, ultrasensitive high efficiency liquid chromatograph – UHPLC) e fonte de ionização eletrospray; 2) Separador de células de alta capacidade (do inglês, high capacity cell sorter), contendo três lasers: violeta (405 nm), azul (488 nm) e vermelho (633 nm). O equipamento apresenta as seguintes configurações de filtros:

Laser	Fluorocromos	Filtros
Violeta (405 nm)	V450	450/40
	V500	510/50
	V605	610/20
	V650	660/20
	V711	710/50
	V786	780/60
Azul (488 nm)	FITC	530/30
	PE	585/42
	A615	616/23
	PerCP	675/20
	A780	780/60
Vermelho (633 nm)	APC	660/20
	Ve720	730/45
	APC-H7	780/60

Os insumos disponíveis na Plataforma a serem selecionados, quando necessário, para realização do serviço, são: meio de cultivo celular (do inglês, Roswell Park Memorial Institute - RPMI); salina tamponada com fosfato (do inglês, phosphate buffered saline - PBS); PBS com 10% de soro fetal bovino; tampão de permeabilidade celular; tampão de fixação celular; tampão de lise para extração de proteínas; kit comercial para dosagem de proteínas totais; ditiotreitól (DTT); iodoacetamida; tripsina; acetonitrila; ácido trifluoroacético; anticorpos para detecção de CD3-APC-H7, CD3-FITC, CD4-V786, CD25-APC, CD127-PE, CD127-A780, CD8-PerCP, CD14-PerCP, CD14-V605, CD19-PerCP, FoxP3-V450, CD69-APC, CD154-V711, CD38-V650; marcador de viabilidade-V510 e material plástico descartável (microtubos, tubos, microplacas e ponteiras).

**Baseado na descrição acima, redija um texto, com o mínimo de 50 linhas e o máximo de 150 linhas, respondendo às seguintes questões:**

- Para a execução do serviço solicitado, por que é necessário utilizar um equipamento de citometria de fluxo do tipo Sorter e não um citômetro convencional? Justifique sua resposta.
- Descreva, detalhadamente, a abordagem a ser utilizada para realização da separação dos linfócitos T reguladores por sorting, incluindo os insumos a serem empregados e a(s) estratégia(s) de gates para a separação da população específica com alto grau de pureza e alta viabilidade.
- Descreva, detalhadamente, a abordagem a ser utilizada para análise proteômica dos linfócitos T reguladores pós-sorting, incluindo os insumos a serem empregados e a(s) estratégia(s) de processamento e análises da amostra.

RASCUNHO

RASCUNHO



RASCUNHO

RASCUNHO

RASCUNHO

