



Concurso Público Fiocruz 2023

Tecnologista em Saúde Pública Prova Discursiva

TE55

Plataforma tecnológica de caracterização de proteínas e citometria de fluxo

Espelho de Resposta

Pontuação da Questão Discursiva conforme Anexo II do Edital nº 2, de acordo com a Unidade detentora da vaga.

Espera-se que o candidato, no desenvolvimento do tema, tenha feito considerações técnicas adequadas sobre os seguintes pontos:

Parte A:

(A) Interação dos Aminoácidos com a Membrana da Célula Tumoral e Características Físico-Químicas:

A membrana plasmática das células tumorais geralmente apresenta uma carga negativa devido à presença de fosfolipídios aniônicos, como fosfatidilserina, e sulfatos glicosaminoglicanos. Portanto, os aminoácidos que interagem melhor com essa membrana são aqueles com carga positiva ou com propriedades hidrofóbicas que permitem uma interação favorável com a superfície carregada negativamente.

Na sequência de 17 aminoácidos da toxina de escorpião (FLKLIPSLVKKSISAFK), os aminoácidos mais propensos a interagir com a membrana tumoral seriam:

- Lisinas (K): Estes aminoácidos carregados positivamente são altamente atraídos pela carga negativa da membrana tumoral. Na sequência fornecida, temos quatro resíduos de lisina (K4, K9, K10, K17).
- Leucinas (L) e Fenilalaninas (F): Aminoácidos hidrofóbicos, como L (resíduos 2 e 5) e F (resíduos 1 e 16), são propensos a interagir com a porção lipídica hidrofóbica

da membrana plasmática. A interação hidrofóbica contribui para a penetração do peptídeo na membrana.

Características Físico-Químicas Relevantes:

Carga Positiva: As lisinas (K) têm cadeias laterais amina carregadas positivamente, o que facilita a atração eletrostática com a superfície tumoral carregada negativamente.

Hidrofobicidade: Aminoácidos como fenilalanina (F) e leucina (L) são hidrofóbicos, promovendo interações com as porções lipídicas da membrana. Isso ajuda na estabilização do peptídeo na membrana e facilita sua inserção.

Duas Técnicas Proteômicas para Identificar a Estrutura Secundária do Peptídeo em Solução e Afinidade de Ligação com o Alvo:

- Dicroísmo Circular (CD):

Objetivo: Determinar a estrutura secundária do peptídeo em solução.

Descrição: A técnica de dicroísmo circular mede a absorção diferencial da luz polarizada circularmente por proteínas ou peptídeos, fornecendo informações sobre a quantidade de estruturas secundárias como α -hélices, folhas- β e estruturas desordenadas. O espectro CD pode ajudar a determinar se o peptídeo adota conformações específicas em solução (ex: uma α -hélice que poderia ser necessária para sua atividade).

Vantagem: Rápida, requer pouca amostra, e pode ser usada para estudar peptídeos em diferentes condições de solvente para simular ambientes biológicos.

- Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR):

Objetivo: Avaliar a afinidade de ligação do peptídeo com a membrana tumoral ou um receptor específico.

Descrição: SPR é uma técnica que permite medir interações biomoleculares em tempo real sem a necessidade de marcar as moléculas. Um dos parceiros da interação (neste caso, o peptídeo) é imobilizado em um sensor, enquanto a membrana ou receptores celulares são passados sobre a superfície. A mudança no índice de refração causada pela ligação permite medir a cinética e a afinidade da interação.

Vantagem: Proporciona dados quantitativos sobre a afinidade de ligação, como as constantes de dissociação (K_d), e permite estudar interações em condições próximas ao ambiente fisiológico.

- Interferometria de Biocamada (BLI)

Objetivo: Quantificação de afinidade e cinética de interação em um formato sem microfluídica.

Descrição: Técnica ótica que mede interações biomoleculares em tempo real sem a necessidade de rótulos. Ela utiliza biossensores de fibra ótica, revestidos com uma camada biocompatível, que detectam alterações na interferência de luz refletida conforme biomoléculas se ligam ou dissociam na superfície do sensor.

Vantagem: Alta sensibilidade, menor risco de entupimento e possibilidade de recuperar amostras. Ideal para análises de alto rendimento e interações de longa duração.

Parte B:

Marcadores Intracelulares e de Superfície:

Peptídeos antitumorais derivados de toxinas podem ser projetados para se ligar a proteínas ou receptores específicos, como marcadores tumorais que são expressos de forma diferencial em células cancerígenas. Ao desenvolver peptídeos que se liguem seletivamente a esses receptores (como HER2, EGFR ou PD-L1), é possível usá-los como sondas em citometria de fluxo para identificar e quantificar células tumorais.

Por exemplo, peptídeos com afinidade por proteínas que estão superexpressas na superfície das células cancerígenas podem servir como marcadores de superfície, permitindo a identificação precisa de células malignas em meio a células normais.

Aplicação na Citometria de Fluxo:

Na técnica de citometria de fluxo, esses peptídeos podem ser conjugados com fluoróforos, o que permite a detecção da presença de células tumorais em amostras de tecido ou sangue. Ao atravessar o citômetro, as células marcadas com os peptídeos fluorescentes emitem sinais que permitem quantificar a expressão dos receptores-alvo.

Diagnóstico e Prognóstico: A análise quantitativa de marcadores de superfície ou intracelulares fornece dados valiosos para o diagnóstico de câncer, ajudando a definir o estágio da doença e sua agressividade. O acompanhamento do perfil de expressão desses marcadores ao longo do tempo também pode ser usado para monitorar a resposta ao tratamento, fornecendo informações prognósticas.

Validação com Inteligência Artificial (IA): A IA pode ser utilizada para analisar grandes volumes de dados de citometria, permitindo identificar padrões complexos de expressão de marcadores. Isso pode melhorar a precisão na escolha dos peptídeos mais eficazes e na interpretação dos resultados clínicos.

Produção de Versões Modificadas do Peptídeo: Para investigar se a atividade antitumoral é mediada pela ligação à membrana ou via intracelular, versões modificadas do peptídeo podem ser marcadas com fluorocromos específicos para análise em citometria de fluxo.

Marcador Extracelular:

- **Protocolo de Marcação:**

1. **Síntese do Peptídeo:** Sintetizar o peptídeo com um marcador fluorescente, como **FITC** ou **APC**.
2. **Incubação:** Incubar as células tumorais com o peptídeo marcado por um período adequado para permitir a ligação com os receptores de membrana.
3. **Lavagem:** Lavar as células para remover o peptídeo não ligado.
4. **Análise:** Utilizar um citômetro de fluxo para analisar a fluorescência e verificar a ligação do peptídeo na superfície celular.

Marcador Intracelular:

- **Protocolo de Marcação:**

1. **Permeabilização da Célula:** Utilizar um agente de permeabilização (como o Triton X-100) para permitir a entrada do peptídeo nas células.

2. **Incubação:** Incubar as células permeabilizadas com o peptídeo em solução, novamente marcado com um fluorocromo como o **Alexa Fluor 647**.
3. **Análise por Citometria de Fluxo:** Após Ensaio, analisar a fluorescência a fim de determinar a presença do peptídeo em compartimentos intracelulares, como o citoplasma ou núcleos, a partir da emissão de fluorescência.

Esses protocolos possibilitam investigar simultaneamente como o peptídeo atua tanto na superfície celular quanto dentro da célula, e qual a sua eventual relação com a atividade antitumoral observada.

Conclusão:

A abordagem combinada de caracterização da toxina, uso de técnicas proteômicas e a aplicação de citometria de fluxo para avaliar modificações no peptídeo levariam a uma melhor compreensão de suas propriedades e potencial terapêutico.