



# 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 fosfolípidios 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  $\alpha$ -hélices, folhas- $\beta$  e estruturas desordenadas. O espectro CD pode ajudar a determinar se o peptídeo adota conformações específicas em solução (ex: uma  $\alpha$ -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.

## **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.