



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:

a) será necessário utilizar um citômetro do tipo Sorter por ser um equipamento capaz de separar linfócitos com fenótipos específicos, correspondentes aos linfócitos T reguladores, com alta viabilidade para uso pós-sorting. O procedimento deve ocorrer em ambiente estéril, pois os linfócitos T reguladores pós-sorting deverão ser utilizados no ensaio de cultivo celular *in vitro* para análise da sua função reguladora. Um citômetro convencional, apesar de identificar fenotipicamente os linfócitos T reguladores, não é capaz de separar linfócitos específicos viáveis que possam ser recuperados em ambiente estéril para experimentos posteriores.

b) para separação dos linfócitos T reguladores por sorting será necessário fazer a incubação das PBMC com a combinação dos anticorpos adequada para o sorting e também o uso do marcador de viabilidade-V510 para monitorar a viabilidade celular. Segundo as regras práticas para a seleção de painéis de marcação mais adequados, a combinação selecionada deve ser CD3-APC-H7, CD4-BV786, CD25-APC, CD127-PE e CD8/CD14/CD19-PerCP. O marcador de viabilidade-V510 também deve ser empregado. O sorting será realizado no separador de células de alta capacidade, equipamento disponível na plataforma, utilizando-se como solução isotônica para o sorting PBS estéril, sendo que o procedimento deve ser realizado em ambiente estéril. Para aquisição da amostra, será necessário estabelecer a estratégia de gates a ser utilizada durante o procedimento. Primeiramente, será realizada a análise de seleção de singletos por gráfico bidimensional de tamanho em área versus tamanho em altura. Após a seleção dos singletos, um novo gráfico bidimensional será construído, considerando tamanho versus complexidade interna para a análise dos aspectos morfométricos das células, em que deverá ser

selecionada a população de linfócitos totais, apresentando baixo tamanho e baixa complexidade interna. Após a seleção de linfócitos totais, deverá ser construído gráfico bidimensional, considerando as seguintes combinações de anticorpos: CD3-APC-H7 versus CD8/CD14/CD19-PerCP em que a população selecionada deverá ser positiva para CD3 e negativa para os demais marcadores, excluindo os tipos celulares que não serão contemplados na população de linfócitos T reguladores. A partir da população de linfócitos T CD3+, deverá ser construído um gráfico bidimensional de CD4-BV786 versus marcador de viabilidade celular-V510, em que será selecionada a população CD4+, negativa ou apresentando baixa positividade para o marcador de viabilidade celular-V510. A partir da seleção dos linfócitos CD4+ viáveis, a próxima seleção será realizada construindo-se um gráfico bidimensional de CD25-APC versus CD127-PE em que deverá ser selecionada a população altamente positiva para CD25-APC e com baixa expressão de CD127-PE, características fenotípicas de linfócitos T reguladores. Esta seleção será utilizada para dar início ao procedimento de separação dos linfócitos T reguladores pelo equipamento em tubos plásticos, contendo pequeno volume de meio de cultura RPMI para garantir a manutenção de uma viabilidade celular alta. Após o término da separação, a análise da pureza da preparação será realizada por meio de aquisição de uma alíquota da amostra pós-sorting no mesmo equipamento utilizado para o sorter e empregando a mesma combinação anteriormente utilizada de marcadores (CD25-APC versus CD127-PE). Após a certificação de que a separação foi obtida com os parâmetros de pureza e viabilidade adequados (acima de 90% de pureza e 90% de viabilidade), os linfócitos T reguladores purificados poderão ser empregados para o cultivo celular *in vitro* e análise posterior da sua função reguladora, bem como para a análise proteômica prevista. Embora a molécula FoxP3 seja um marcador de linfócitos T reguladores, para este procedimento, este reagente não poderá ser utilizado, pois para sua detecção seria necessário realizar a permeabilização da membrana celular, procedimento que inviabilizaria a manutenção da viabilidade das células, essencial para o cultivo *in vitro* pós-sorting requerido.

c) após a obtenção dos linfócitos T reguladores purificados pós-sorting para que a análise proteômica seja realizada, algumas etapas devem ser seguidas. Inicialmente, será realizada a extração de proteínas, utilizando tampão de lise para a obtenção de proteínas totais. Após esse procedimento, deverá ser realizada a dosagem de proteínas totais para verificação da concentração de proteínas na amostra a ser testada, por meio de kit comercial para dosagem de proteínas totais. Posteriormente, será realizada a redução das proteínas com ditioneitol (DTT) e a alquilação com iodoacetamida (IAA). Em seguida, deverá ser realizada a digestão enzimática das proteínas com tripsina, considerando uma concentração mínima de 50 microgramas de proteínas totais para execução desse procedimento com posterior remoção de sais por coluna específica. Posteriormente, a amostra será precipitada pela incubação com ácido trifluoroacético e os peptídeos obtidos serão aplicados no equipamento espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo líquido de alta eficiência ultrasensível (UHPLC), disponível na Plataforma. Primeiramente, os peptídeos serão aplicados no UHPLC por extração em fase sólida, com coluna específica, e eluídos com ácido trifluoroacético. Posteriormente, serão submetidos à separação em cromatografia líquida em coluna específica e em gradiente de acetonitrila. Após a separação dos peptídeos pelo UHPLC, os mesmos serão direcionados, por junção líquida, ao espectrômetro de massas e submetidos à ionização por eletrospray. Os espectros de íons precursores deverão ser obtidos com resolução adequada (mínimo de 50.000) e exportados para a busca de identidades de proteínas,

utilizando-se software específico, considerando-se os seguintes parâmetros: digestão triptica; sítios de clivagem perdidos (missed cleavages); carbamidometilação de resíduos de cisteínas; oxidação de metioninas; presença de modificações pós-traducionais por peptídeo; janela de tempo de retenção; tolerância máxima de erro para íons precursores monoisotópicos (MS1) e para fragmentação de íons produtos (MS2). A busca de identidades deverá ser filtrada com um False Discovery Rate (FDR) próximo de 1% e valor de $p \leq 0,05$. Os dados obtidos serão comparados com base de dados acessível e de anotações de alta qualidade sobre as sequências de proteínas humanas e as suas funções, destacando-se as proteínas mais ou menos abundantes e a qual grupo principal de proteínas pertencem. Dessa forma, será obtida a análise proteômica dos linfócitos T reguladores, conforme o serviço solicitado à Plataforma.