



INCA INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER

CONCURSO PÚBLICO

CARGO 42:
TECNOLOGISTA JÚNIOR

ÁREA:
BIOLOGIA OU BIOMEDICINA
OU FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA

ESPECIALIDADE:
CITOMETRIA DE FLUXO
EM ONCO-HEMATOLOGIA

CADERNO DE PROVAS – PARTE II
Conhecimentos Específicos e Discursiva

MANHÃ

LEIA COM ATENÇÃO AS INSTRUÇÕES ABAIXO.

- 1 Nesta parte II do seu caderno de provas, confira atentamente se os seus dados pessoais e os dados identificadores do seu cargo transcritos acima estão corretos e coincidem com o que está registrado em sua folha de respostas e em sua folha de texto definitivo da prova discursiva. Confira também o seu nome e o nome de seu cargo em cada página numerada desta parte de seu caderno de provas. Em seguida, verifique se o seu caderno de provas (partes I e II) contém a quantidade de itens indicada em sua folha de respostas, correspondentes às provas objetivas, e a prova discursiva, acompanhada de espaço para rascunho. Caso o caderno esteja incompleto, tenha qualquer defeito ou apresente divergência quanto aos seus dados pessoais ou quanto aos dados identificadores do seu cargo, solicite ao fiscal de sala mais próximo que tome as providências cabíveis, pois não serão aceitas reclamações posteriores nesse sentido.
- 2 Quando autorizado pelo chefe de sala, no momento da identificação, escreva, no espaço apropriado da **folha de respostas**, com a sua caligrafia usual, a seguinte frase:

Não existe mais calma do que a gerada pela razão.

OBSERVAÇÕES

- Não serão objeto de conhecimento recursos em desacordo com o estabelecido em edital.
- Informações adicionais: telefone 0(XX) 61 3448-0100; Internet – www.cespe.unb.br.
- É permitida a reprodução deste material apenas para fins didáticos, desde que citada a fonte.

CONHECIMENTOS ESPECÍFICOS

A biologia celular estuda a estrutura, as funções e o funcionamento das células nos seres vivos. Com o avanço da tecnologia microscópica e o auxílio das técnicas de citoquímica, a biologia celular tornou-se mais específica e as estruturas celulares, mais estudadas. Acerca desse tema, julgue os itens subsequentes.

- 41 A fluidez da bicamada lipídica da membrana celular é essencial na transdução de sinal para uma grande variedade de moléculas biologicamente ativas, as quais ativam funções celulares como a diferenciação e a proliferação celular. As células tumorais têm caracteristicamente um aumento da fluidez e uma diminuição da estabilidade da membrana citoplasmática.
- 42 As enzimas dos lisossomos variam com o tipo de célula. Porém todas têm atividade enzimática em pH 5,0 e as mais comuns são fosfatase ácida, ribonuclease, protease e lipase.
- 43 Quando as células de defesa como os macrófagos do sangue humano englobam uma bactéria por pinocitose, forma-se no interior da célula um pequeno vacúolo denominado pinossomo.
- 44 As mitocôndrias são organelas presentes em todos os seres vivos, sendo responsáveis pela geração da maior parte da energia, que é convertida em ATP e calor por meio de fosforilação oxidativa.
- 45 Polirribossomos são grupos de ribossomos unidos por uma molécula de RNA mensageiro. Os polirribossomos traduzem mRNAs que codificam proteínas para serem segregadas nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso.
- 46 Algumas células ativam a capacidade de apoptose que seria como uma morte programada. Esse fenômeno, apesar de destruir a célula, tem grande importância para as funções normais do organismo.

As imunoglobulinas são anticorpos de origem humana, obtidos de plasma com concentrações adequadas de anticorpos para a doença contra a qual se quer estabelecer imunidade, ou de origem animal, sob prévia imunização ativa. A respeito desse tema, julgue os itens a seguir.

- 47 As imunoglobulinas são cadeias de polipeptídios. Cada unidade de imunoglobulina (monômero) compõe-se de duas cadeias leves e duas pesadas, ligadas por pontes dissulfídicas.
- 48 As cadeias leves e pesadas da molécula das imunoglobulinas caracterizam a classe do anticorpo, sendo que as cadeias leves determinam a classe dos anticorpos IgG, IgM, IgA, IgD, IgE.
- 49 Quando imunoglobulinas se unem formando dímeros, trímeros ou pentâmeros, o número de antígenos a que o anticorpo poderá ligar-se aumenta. Esse fenômeno se chama valência de um anticorpo.
- 50 Receptores de linfócitos B possuem a mesma estrutura de imunoglobulinas, mais especificamente de IgG e IgD, diferindo apenas em um prolongamento a mais na cadeia pesada para poder se ancorar na superfície do linfócito.

De acordo com a sua estrutura, as imunoglobulinas podem ser classificadas em classes, sendo que cada uma delas possui características diferenciadas quanto à estrutura e à função na imunologia. Acerca das funções das classes de imunoglobulinas, julgue os itens seguintes.

- 51 A imunoglobulina IgE é monomérica com um domínio a mais. Ela encontra-se ligada a mastócitos e basófilos, podendo ser encontrada no cordão umbilical, nas mucosas e no colostro.
- 52 A IgA pode-se apresentar de forma monomérica ou polimérica. Ela não fixa complemento pela via clássica, mas agregados dessa imunoglobulina podem fixar complemento pela via alternativa. Normalmente ela é encontrada em níveis elevados na presença de infecções parasitárias.
- 53 A IgG se apresenta em forma de monômeros e as subclasses diferem no número de pontes dissulfeto e no comprimento da região da dobradiça. Ela é considerada a mais versátil imunoglobulina porque é capaz de realizar todas as funções das moléculas de imunoglobulinas. A IgG corresponde a 75% das imunoglobulinas presentes no soro.
- 54 A estrutura da IgD existe somente como um monômero. Ela é encontrada em baixos níveis no soro, onde seu papel é duvidoso. Em infecções crônicas, seu nível diminui consideravelmente.

A citometria de fluxo, tecnologia baseada no emprego de radiação *laser*, fluxo hidrodinâmico, ótica, substâncias fluorescentes (fluorocromos) e recursos de informática, é utilizada para determinar algumas características estruturais e funcionais de partículas biológicas. A respeito desse tema, julgue os itens que se seguem.

- 55 Os citômetros atuais mais sofisticados podem possuir até dezesseis detectores em simultâneo, o que permite analisar múltiplas possibilidades de características celulares e(ou) componentes celulares de um elevado número de células de forma individual.
- 56 Além do *laser*, componentes eletrônicos, computadores e filtros óticos têm um papel essencial no rendimento dos citômetros de fluxo. A função de alguns filtros é absorver alguns comprimentos de onda e deixar passar a luz com o comprimento de onda de interesse. A qualidade de tais filtros é da maior importância na citometria de fluxo.
- 57 A citometria de fluxo pode ser usada para determinadas células em suspensão, promovendo, por meio da análise de tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência dessas células, a sua identificação, mas não a sua quantificação.
- 58 O citômetro de fluxo é um aparelho utilizado para avaliação da emissão de fluorescência das células. Alguns aparelhos são capazes de separar fisicamente as células, de acordo com as suas características morfológicas.
- 59 Os fluorocromos para citometria de fluxo oferecem um método sensível para obter informação acerca da estrutura, função e vitalidade das células. Fluorocromos de ligação covalente, devido a sua composição molecular especial, unem-se a determinados componentes celulares, enquanto os fluorocromos que não se ligam covalentemente são reativos e usados para marcar proteínas, lipídios ou outras moléculas biológicas. O fluorocromo mais empregado é a fluoresceína.
- 60 Alguns tipos de fluorocromos utilizados na citometria de fluxo são a fluoresceína, a rodamina, Texas red, a hematoxilina, cianinas, a ficoeritrina e, mais recentemente, tem ocorrido o uso de sondas de DNA unidas a fluoresceína e os anticorpos antibromodeoxiuridina.

A citometria de fluxo possibilita analisar o conteúdo de DNA e RNA, definir em que posição do ciclo celular a célula se encontra, analisar cromossomos, determinar células cancerígenas que apresentem alterações na sua taxa normal de DNA e células que se encontrem em processo de morte programada (apoptose) ou necrose. Acerca desse tema, julgue os próximos itens.

- 61 A amostra analisada em citometria de fluxo deve-se encontrar em forma de suspensão. Existem amostras que precisam de um mínimo de processamento, como o sangue periférico, a medula óssea, ou outros fluidos biológicos, enquanto tumores sólidos ou amostras parafinadas não podem ser analisados com esse método por necessitarem de degradação mecânica forte para garantir a suspensão.
- 62 Um procedimento padrão de detecção de patologias na citometria de fluxo pode ser descrito da seguinte maneira: as células que serão analisadas se acoplam a um fluorocromo, diretamente ou por meio de uma proteína, geralmente um anticorpo monoclonal que reconhece um epítipo específico da célula; posteriormente, as células suspensas em uma solução fisiológica são injetadas em um sistema de fluidos para serem expostas individualmente a um jato de luz focalizada (*laser*), o qual, ao chocar-se com cada célula, se desvia, sendo essa mudança de direção registrada por detectores especiais.
- 63 As técnicas de citometria de fluxo têm sido utilizadas para determinar a contagem diferencial de células da medula óssea e a maturação de megacariócitos, quantificar a taxa de proliferação celular e detectar e diferenciar leucemias e síndromes mielodisplásicas.
- 64 Uma das vantagens da citometria de fluxo em analisar células individualmente consiste na detecção de vários estados fisiológicos celulares intermediários que realmente existem em determinada população, descobrindo assim uma heterogeneidade nunca antes revelada.
- 65 A metodologia da citometria de fluxo, apesar do seu alto custo, de não analisar quantitativamente e da necessidade de técnicos especializados, permite uma análise rápida, eficiente e qualitativa de células em suspensão, tendo ampla aplicação na hematologia.

Quanto às bases biológicas celulares do transplante de células-tronco hematopoéticas (CTHs), julgue os itens que se seguem.

- 66 Utilizando-se técnicas de citometria de fluxo e *cell sorting*, é possível selecionar uma população enriquecida de CTHs com o uso do corante Hoechst 33342, ou, alternativamente, iodeto de propídeo.
- 67 A obtenção de CTHs destinadas a transplantes pode ser feita a partir de sangue periférico. Nesse caso, é necessário submeter o doador a tratamento para mobilização das células de interesse.
- 68 O sangue do cordão umbilical somente pode ser utilizado como fonte de CTHs para transplantes autólogos, pois, em casos alogênicos, tal medida elicitaria a doença do enxerto contra hospedeiro (*graft-versus-host disease*), por causa da diversidade celular ali presente.
- 69 As CTHs destinadas a transplantes devem, obrigatoriamente, sofrer o processo de criopreservação antes de serem enxertadas em novo hospedeiro.
- 70 A criopreservação de CTHs requer o uso de um agente anticongelante, como o dimetilsulfóxido (DMSO), e armazenagem em *freezer* mecânico a -80°C ou tanque de nitrogênio líquido.

Julgue os itens a seguir, relativos a sangue e hematopoese.

- 71 Todos os elementos figurados do sangue provêm de CTHs, que podem ser definidas funcionalmente, em humanos, pela presença do antígeno de superfície CD34, ausência de CD38 e ausência de antígenos do tipo Lin (*Lineage*).
- 72 Assumindo-se que parte da hematopoese fetal humana ocorre no fígado, do ponto de vista biológico, esse órgão poderia ser utilizado como fonte de CTHs, porém, há óbvios impedimentos éticos para tanto.
- 73 Na hematopoese, CTHs indiferenciadas podem dar origem a progenitoras comprometidas das linhagens linfóides ou mielóides, originando, neste caso, após ciclos de expansão e diferenciação, plaquetas, basófilos, eosinófilos, NK (*natural killers*) e macrófagos, entre outros.
- 74 Na medula óssea, as CTHs se encontram em um nicho, constituído em grande parte por células estromais que secretam uma matriz rica em moléculas de adesão e interleucinas, com finalidade única de prover suporte físico.
- 75 Na medula óssea, pode ser observada uma hierarquia local durante a maturação das CTHs. As mais imaturas (mais primitivas) encontram-se muito distantes de tecidos vasculares, enquanto que o processo de maturação faz que elas se aproximem destes.

Com relação aos princípios da separação celular por *cell sorting*, julgue os próximos itens.

- 76 A partir de uma amostra heterogênea de células, uma subpopulação pode ser selecionada por suas características físicas e(ou) fenotípicas, tais como granulocidade e expressão de marcadores de superfície.
- 77 Quando se deseja obter a maior quantidade possível de células de interesse cuja ocorrência em uma amostra é em geral reduzida, pode-se realizar o *cell sorting* no modo operacional de enriquecimento, *enrich mode*, nos citômetros nos quais essa opção esteja disponível.
- 78 *Cell sorting* pode ser realizado por deflexão eletrostática ou divergência mecânica do fluxo. Nesse caso, além de obter-se um número maior de células totais selecionadas, a quantidade relativa de células de interesse (positivas reais) é maior.

Julgue os itens subsequentes, acerca das técnicas de marcação para a análise por citometria de fluxo.

- 79 O uso de detergentes fracos, como a saponina, é recomendado para a marcação de moléculas intracelulares.
- 80 O alaranjado de acridina é corante inespecífico, que pode se ligar tanto em DNA quanto em RNA, o que poderá deturpar uma análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo.
- 81 A utilização de EGTA no tampão de preparação de células a serem marcadas com indo-1 não é recomendada porque poderá influenciar o resultado da análise.

Julgue os itens subsequentes, Acerca de *cell sorting*.

- 82 Citômetros podem utilizar componentes mecânicos para realizar o *cell sorting*, como, por exemplo, braços mecânicos que se movem e coletam parte do fluxo, no caso de eventos positivos.
- 83 *Cell sorting* por deflexão eletrostática depende do chamado *break off point*, ou seja, do ponto onde o fluxo passa a fluir gota a gota, porém independe da amplitude do transdutor.

Sobre os *lasers* e espectros de emissão e excitação dos corantes utilizados em citometria de fluxo, julgue os itens que se seguem.

- 84 O princípio do deslocamento de Stokes é a base para utilização de *lasers* e fluoróforos em citometria de fluxo.
- 85 A compensação é necessária quando são utilizados dois ou mais fluoróforos cujos espectros de emissão se sobrepõem parcialmente, independentemente de seus espectros de excitação.
- 86 Fluoresceína e Texas red possuem, respectivamente, as excitações máximas a 495 nm e 596 nm, e as emissões máximas a 520 nm e 570 nm.
- 87 Os *lasers* que podem ser utilizados para citometria de fluxo provêm dos gases argônio, hélio-neônio (mistura) e criptônio e podem emitir luz em comprimentos de onda que variam aproximadamente entre 360 nm a 560 nm.
- 88 A utilização de dois fluoróforos conjugados, por exemplo, ficoeritrina e cianina 5 não é possível para análises em citometria de fluxo.

Quanto ao princípio de compensação de sinais na citometria de fluxo, julgue os próximos itens.

- 89 Ao se realizar a compensação entre dois corantes experimentalmente, é necessário utilizar, pelo menos, três concentrações distintas de cada corante, pois a quantidade de fluoróforo presente irá alterar a quantidade de sobreposição nos espectros de emissão.
- 90 O protocolo de compensação para um corante do tipo *in tandem* ou RET (*resonance energy transfer*) pode ser o mesmo que aquele utilizado para compensação de dois corantes simples.
- 91 Considerando-se que a porcentagem de compensação necessária depende apenas do tipo de fluoróforos a serem utilizados, a taxa de compensação a ser empregada deve-se manter a mesma de experimento a experimento e de citômetro a citômetro, desde que os mesmos fluoróforos sejam utilizados.
- 92 *Beads* ou contas podem ser utilizadas para realizar a compensação. Nesse caso, deve ser dada preferência àquelas que precisam ser marcadas pelo próprio pesquisador ou técnico responsável, para evitar variação devido a diferenças de marcas de sondas fluorescentes.

Julgue os seguintes itens, referentes aos procedimentos de coleta e processamento de CTHs para transplantes.

- 93 As unidades de células progenitoras hematopoéticas provenientes de sangue periférico e da medula óssea devem ser submetidas não só a contagem total de células nucleadas, como também de células CD34 positivas.
- 94 Considerando-se que o sangue do cordão umbilical é fetal, para obtenção de CTHs a partir de tal fonte, fica a mãe dispensada de testes clínicos laboratoriais para testes de doenças infecciosas, exceto HIV-1, HTLV e HBV.
- 95 As CTHs provenientes da medula óssea destinadas a transplantes devem ser submetidas a duas filtrações: a primeira para remover macroagregados, e a segunda, para remover microagregados. Os filtros utilizados podem ser descartáveis ou passíveis de reesterilização.
- 96 Um histograma do tipo quantidade de eventos *versus* anti-CD34-fluorescência não seria o único gráfico oriundo de citometria de fluxo a ser analisado durante o processamento de CTHs provenientes do cordão umbilical.

Considerando que um pesquisador, com o intuito de acompanhar experimentalmente a diferenciação de uma população de CTHs, transfecte-as com a proteína EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*), e assumindo que o espectro de emissão de EYFP varia de 510 nm a 600 nm, com emissão máxima ao redor de 520 nm, julgue os itens que se seguem.

- 97 Espera-se que, na análise por citometria de fluxo, a utilização concomitante de Hoechst 33342 requeira pouca ou nenhuma compensação, porque os espectros de emissão apresentam reduzida sobreposição.
- 98 Após a diferenciação celular, a análise da fluorescência emitida a 520 nm em regiões determinadas (*gates*) de gráficos do tipo FSC *versus* SSC (*forward scatter versus side scatter*) poderá fornecer informação da porcentagem de células iniciais que seguiu a linha linfóide ou mieloide.
- 99 Considerando-se que o espectro de excitação de EYFP variasse, aproximadamente, de 450 nm a 530 nm, com máximo a 510 nm, *lasers* de argônio ou hélio-neônio poderiam ser utilizados.
- 100 A utilização de um anticorpo anti-CD45 conjugado a PerCP permitiria a determinação da porcentagem de células iniciais que deu origem a leucócitos *versus* plaquetas e eritrócitos.

PROVA DISCURSIVA

- Nesta prova, faça o que se pede, usando o espaço para rascunho indicado no presente caderno. Em seguida, transcreva o texto para a **FOLHA DE TEXTO DEFINITIVO DA PROVA DISCURSIVA**, no local apropriado, pois **não serão avaliados fragmentos de texto escritos em locais indevidos**.
- Qualquer fragmento de texto além da extensão máxima de linhas disponibilizadas será desconsiderado.
- Na **folha de texto definitivo**, identifique-se apenas no cabeçalho da primeira página, pois **não será avaliado** texto que tenha qualquer assinatura ou marca identificadora fora do local apropriado.

Os perfis imunofenotípicos das células mononucleadas de uma paciente à época do diagnóstico da leucemia linfoblástica aguda pré-B e cerca de dois meses após a quimioterapia podem ser informadas graficamente, constituindo importante recurso para análise e diagnósticos dos perfis imunofenotípicos em questão.

Considerando que o fragmento de texto acima tem caráter unicamente motivador, redija um texto dissertativo acerca do seguinte tema.

USO DA CITOMETRIA DE FLUXO EM DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS HEMATO-ONCOLÓGICAS

Ao elaborar seu texto, aborde, necessariamente, os seguintes tópicos:

- ▶ aspectos medidos pela citometria de fluxo que permitem o diagnóstico;
- ▶ hematopoese normal e expressão de antígenos de superfície;
- ▶ utilização da citometria em transplantes de células-tronco hematopoéticas.

RASCUNHO

1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	
29	
30	