



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013
Chave de Correção da Prova Prática

Cargo:
E-27 - Tecnólogo - Farmácia - Análise de proteínas por técnicas eletroforéticas em gel

QUESTÃO 1:

Formas recombinantes da glicoproteína endógena eritropoietina (EPO) têm sido utilizadas como agentes dopantes por atletas de alto rendimento desde o início da década de 1990. Tais substâncias eram consideradas indetectáveis no controle de dopagem no esporte até o início do século XXI. Esse cenário foi modificado após pesquisadores do Laboratório de Controle de Dopagem de Paris desenvolverem um método de detecção por eletroforese em gel (focalização isoeletrica). Mais de uma década depois dessa contribuição, tal método ainda se constitui na base para a detecção de diferentes eritropoietinas recombinantes (rEPOs) e análogos.

Esse método sofreu poucas modificações quando implementado nos diferentes laboratórios. Mas o conceito e as etapas principais permanecem. O método é conhecido pelo nome genérico IEF-PAGE.

Uma variante do método desenvolvido pelo Laboratório de Paris pode ser didaticamente dividido em quatro etapas como, apresentado no Esquema 1.

Etapas:
Etapas 1: Concentração da amostra / obtenção do retentato.

Etapas 2: Aplicação do retentato / eletroforese.

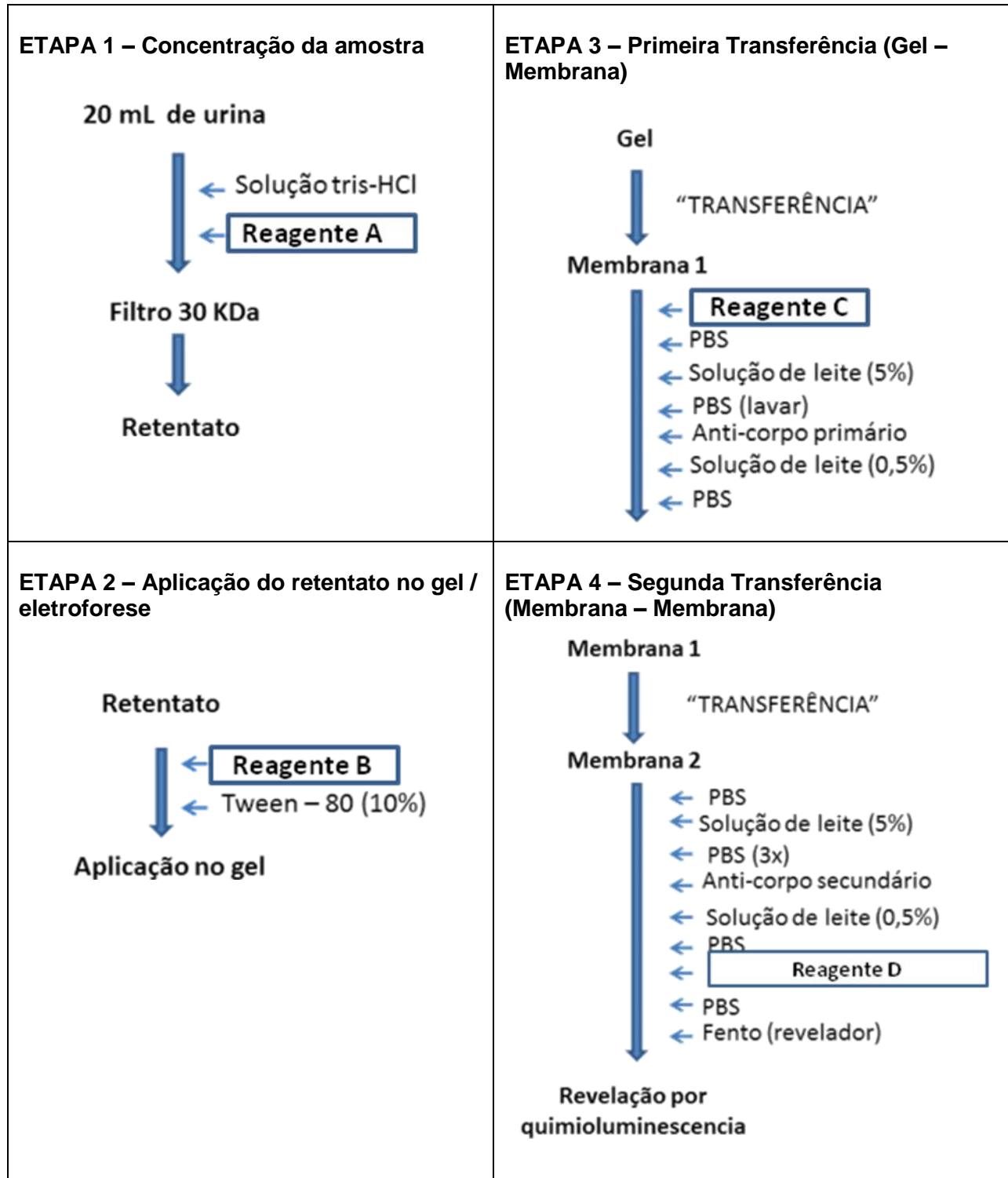
Etapas 3: Primeira transferência.

Etapas 4: Segunda transferência / revelação.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013
Chave de Correção da Prova Prática

Esquema 1. Esquema resumido do método de análise de eritropoietina por focalização isoelétrica apresentado didaticamente dividido em quatro etapas.





UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013
Chave de Correção da Prova Prática

Observação:

Anticorpo primário: anticorpo monoclonal de camundongo anti EPO humana.

Anticorpo secundário: anticorpo policlonal biotilado de cabra anti IgG de camundongo.

Observando o Esquema 1:

Item A) Proponha quais seriam os reagentes A, B, C e D.

Chave de Correção	
Respostas	Qtde de Pontos
Reagente A. Solução inibidora de proteases/"complete"/ coquetel inibidor de proteases.	4
Reagente B. Uréia (ou outro desnaturante).	4
Reagente C. Ditioneitol (DTT)/agente redutor.	4
Reagente D. Enzima estreptavidina-peroxidase/HRP/Horseradish Peroxidase.	4
Total	16

Item B) Detalhe a função destes reagentes no contexto da detecção de rEPO via gel de IEF.

Chave de Correção	
Respostas	Qtde de Pontos
Reagente A. Inibição da ação de enzimas urinárias que clivem a cadeia da proteína alvo.	4
Reagente B. Uréia (ou outro desnaturante). Desestabilizador de ligações hidrofóbicas/solubilização da proteína/agente caotrópico.	4
Reagente C. Ditioneitol (DTT). Redução de pontes de dissulfeto.	4
Reagente D. Enzima estreptavidina-peroxidase: Formação do complexo avidina-biotina/ligação da enzima ao anticorpo secundário/amplificador do sinal.	4
Total	16

Item C) A Etapa de confirmação para a análise de EPO preconiza, além do IEF-PAGE, o método também conhecido pelo nome genérico SDS-PAGE. A respeito da necessidade de aplicação de dois métodos distintos na etapa confirmação, responda:

No caso dos resultados serem divergentes, como o analista deve classificar a amostra? Adversa, atípica, presumível ou negativa?

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
Resultado Atípico.	8



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013
Chave de Correção da Prova Prática

QUESTÃO 2:

A interpretação dos resultados do método de detecção de eritropoietina recombinante (rEPO) por focalização isoeétrica (IEF-PAGE) está baseada na análise do densitograma obtido a partir da revelação da membrana de transferência, após aplicação de um anticorpo secundário e posterior revelação por quimioluminescência. A Figura 1 apresenta um exemplo dos resultados de um lote analítico de triagem (procedimentos iniciais de análise), composto por controles de qualidade positivos para rEPO e NESP (ex: *Lanes 1, 8 e 15*), controles de qualidade negativos (ex: *Lane 2, 5 e 19*), e amostras.

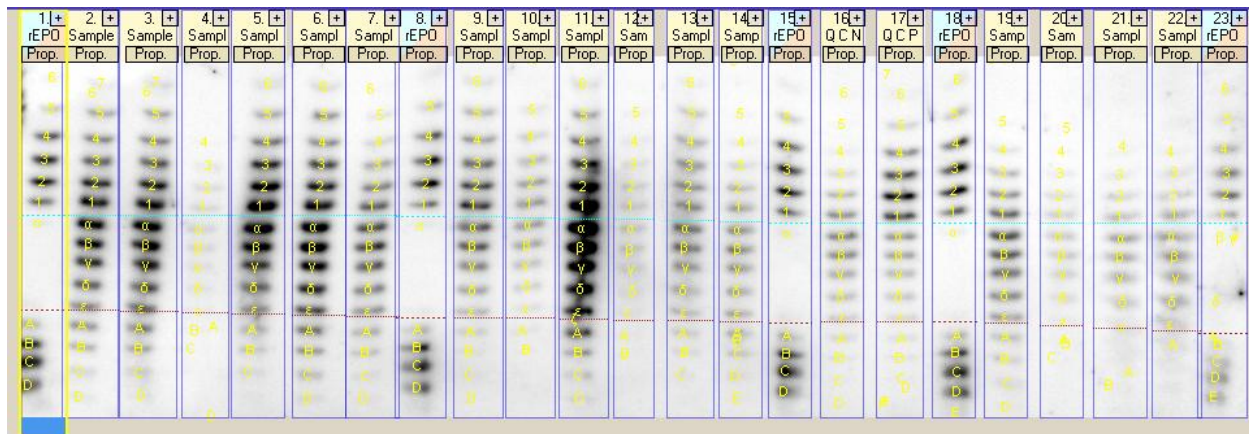


Figura 1. Imagem de um lote analítico de triagem para análise de rEPO e análogos por focalização isoeétrica (IEF-PAGE).

A Tabela 1 apresenta os resultados dos densitogramas obtidos para as amostras 7, 9 e 10.

	Amostra 7		Amostra 9		Amostra 10	
	Volume Absoluto	Volume Normalizado	Volume Absoluto	Volume Normalizado	Volume Absoluto	Volume Normalizado
7	87,35	0,02	526,68	0,23	709,3	0,22
6	53677,94	13,55	14682,08	6,42	10575,6	3,28
5	141123,30	35,61	7606,71	3,32	32307,3	10,02
4	191386,70	48,30	25753,94	11,25	71450,1	22,16
3	323554,20	81,65	62640,35	27,37	225699,7	70,00
2	329018,70	83,03	118522,60	51,80	264874,8	82,15
1	396278,00	100,00	203139,20	88,78	322428,2	100,00
α	333808,70	84,24	228824,70	100,00	264358,9	81,99
β	300874,90	75,93	203006,10	88,72	245754,8	76,22
γ	216956,70	54,75	137440,10	60,06	192747,6	59,78
δ	163989,60	41,38	101898,70	44,53	132163,3	40,99
ε	107888,40	27,23	76891,67	33,60	81477,6	25,27
A	55669,85	14,05	39412,58	17,22	48847,9	15,15
B	15350,61	3,87	24007,36	10,49	26729,3	8,29
C	27874,28	7,03	11043,11	4,83	20055,0	6,22
D	3318,27	0,84	2694,14	1,18	3288,8	1,02



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013
Chave de Correção da Prova Prática

Responda:

Item A) À luz dos critérios de interpretação de resultados para a técnica de IEF, estabelecidos pela Agência Mundial Anti-Dopagem para análise de rEPO, classifique as amostras 7, 9 e 10 como negativas, atípicas, presumíveis ou adversas? Justifique sua resposta.

Chave de Correção	
Respostas	Qtde de Pontos
Amostra 7. Negativa. O candidato deve justificar baseado nos critérios presentes no documento técnico TD2013EPO.	5
Amostra 9. Negativa. O candidato deve justificar baseado nos critérios presentes no documento técnico TD2013EPO.	5
Amostra 10. Considerando confirmação: adversa. Considerando triagem: presumível. Ambas as respostas serão consideradas. O candidato deve justificar baseado nos critérios presentes no documento técnico TD2013EPO.	5
Total	15

Item B) Utilizando os conhecimentos a respeito do tema Análise de Proteínas, cite duas metodologias utilizadas para o enriquecimento de proteínas (isolamento e concentração em fluidos biológicos).

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
Imunopurificação, ultra-filtração, outras tipicamente citadas na literatura.	5

Item C) Ainda baseando-se nos conhecimentos a respeito do tema Análise de Proteínas, descreva os fundamentos da técnica de focalização isoelétrica.

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
Descrição dos fundamentos da técnica. Proteínas são separadas de acordo com a sua carga elétrica em um gradiente de pH pré-estabelecido. As proteínas param de migrar no valor de pH onde o somatório de suas cargas for igual a zero, ou seja, seu ponto isoelétrico (pI).	10

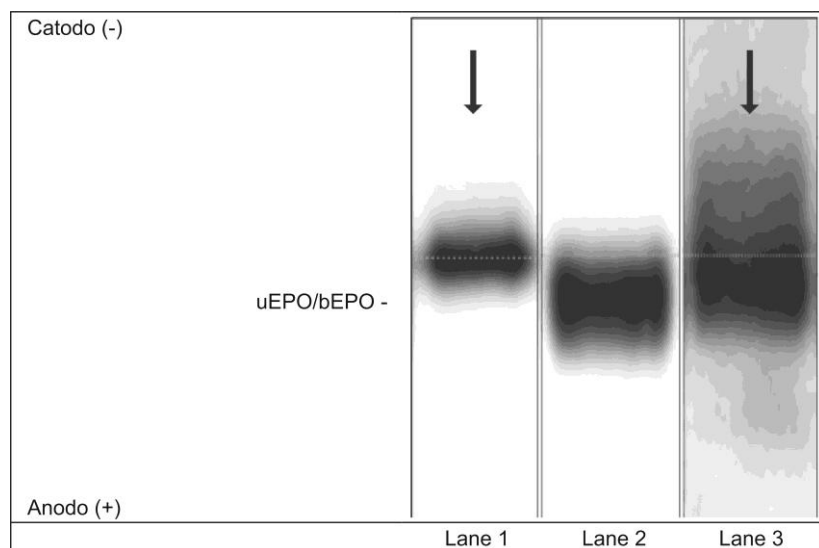


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013
Chave de Correção da Prova Prática

QUESTÃO 3:

A técnica conhecida como SDS-PAGE é extremamente útil na monitoração/identificação do uso de eritropoietina recombinante (rEPO) ou análogos. Urina e sangue podem ser utilizados como matriz de análise. Através da técnica de SDS-PAGE, as rEPOs podem ser diferenciados do hormônio endógeno (uEPO / bEPO) através do formato característico das bandas e diferentes massas moleculares. Usualmente a interpretação considera a migração relativa em cada *lane*, em relação a migração da uEPO / bEPO.

A figura a seguir apresenta a imagem de um gel de SDS-PAGE. O *lane* 2 representa uma amostra fortificada com uEPO/bEPO.



De acordo com os critérios de identificação da Agência Mundial Anti-Dopagem para análise de SDS-PAGE:

Item A) Interprete os resultados obtidos nos *lanes* 1 e 3 (marcados pela setas).

Chave de Correção	
Respostas	Qtde de Pontos
Lane 1 – Dynepo.	6
Lane 2 – Mistura de uEPO e rEPO.	6
Total	12



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013
Chave de Correção da Prova Prática

Item B) Descreva a diferença entre as técnicas SDS-PAGE e SAR-PAGE. Em que situação sugere-se a utilização da segunda?

Chave de Correção	
Respostas	Qtde de Pontos
SDS-PAGE. Utiliza gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio como tensoativo.	4
SAR-PAGE. Utiliza gel de poliacrilamida com lauroil sarcosinato de sódio como tensoativo.	6
A SAR-PAGE pode ser utilizada como etapa de triagem ou na confirmação do resultado de CERA (<i>Continuous Erythropoietin Receptor Activator</i>).	8
Total	18