

Roteiro de aula prática
Ensaio de sensibilidade de *Leishmania amazonensis* a
fármacos e observação de tripanossomatídeos não
patogênicos ao homem

PARTE I

Observação de tripanossomatídeos não patogênicos ao homem

Montem lâminas com 10 µl das culturas das garrafas A, B, C e D cobrindo com lamínulas. Observem ao microscópio e desenhem as formas presentes na folha de atividades.

PARTE II

Ensaio de sensibilidade a fármacos

Parasita: promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269)

A. Observe uma cultura de *Leishmania (L.) amazonensis* viva em microscópio invertido.

B. Ensaio

Para cada fármaco, diferentes doses foram adicionadas em placas de 96 poços em um volume final de 100 µL de meio M-199.

Foram então adicionados a cada poço 100 µL de promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária, ressuspensos em meio M199 para 2×10^7 células/mL. As placas contendo parasitas e fármacos foram mantidas em estufa a 25 °C por 24 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT

Ensaio de MTT

A viabilidade celular foi avaliada por MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide).

20 µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço da placa, que foi incubada por 4 h a 25 °C.

A reação foi interrompida adicionando-se 80 µL de 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) por poço.

A densidade óptica (DO) foi determinada a 550 nm.

Com base na tabela de dados fornecida, realize a atividade solicitada.

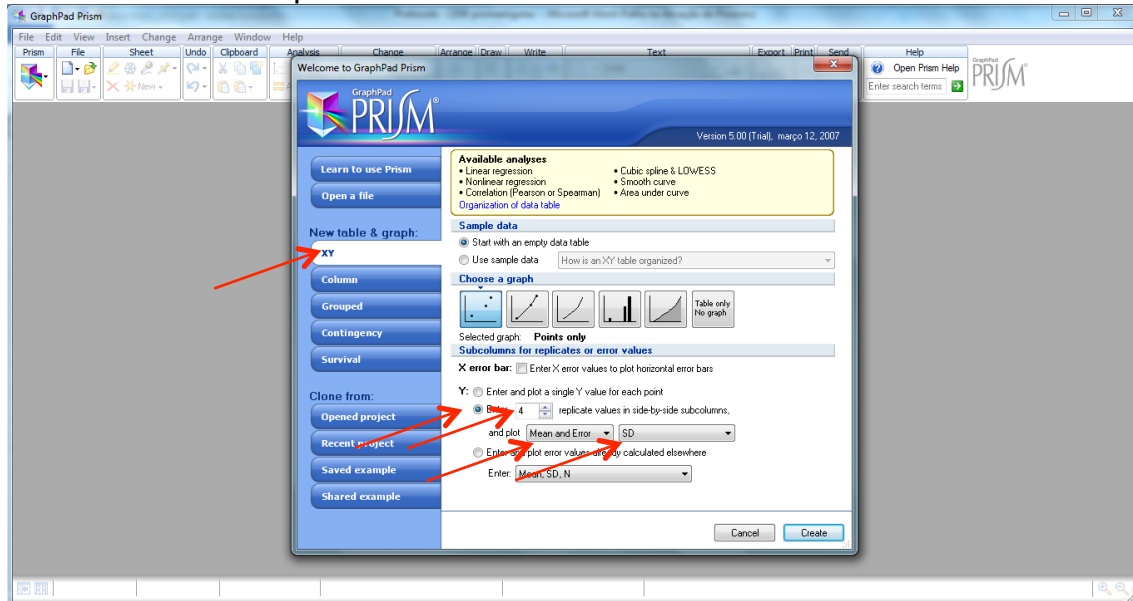
ATIVIDADE:

Cálculo da Concentração efetiva 50% (CE₅₀)

A CE₅₀ será determinada a partir de curvas de regressão sigmoidal feitas no programa Graph Pad Prism 5.0, seguindo as instruções a seguir.

Construção de Curva de CE₅₀ com o programa Graph Prism 5.0

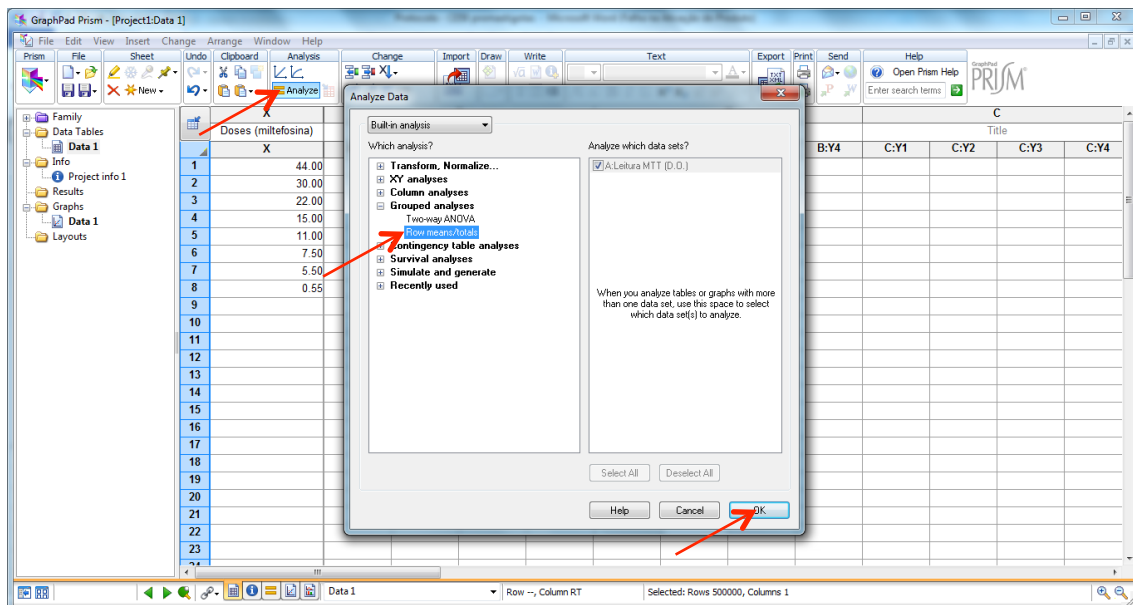
Abrir um novo arquivo conforme as setas:



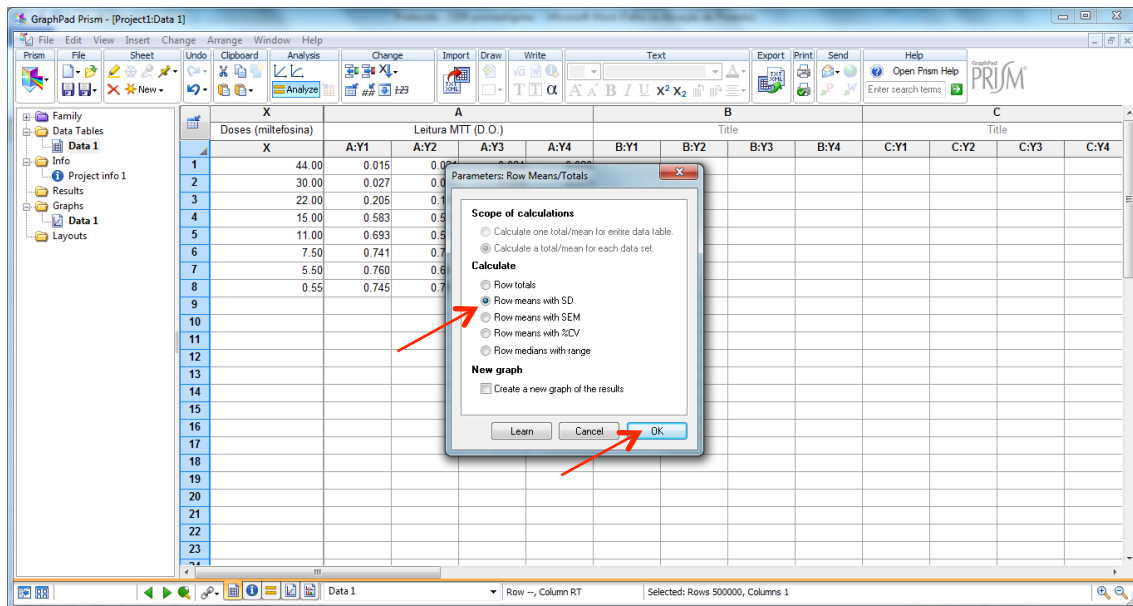
Digitar as concentrações na primeira coluna (X), em ordem decrescente e as DOs ou porcentagens nas demais (A:Y1, A:Y2, A:Y3 e AY4). No controle não tratado, digitar um valor de concentração pelo menos 10 vezes menor do que a menor concentração usada. Observação: Quando for usar os valores de D.O. do ensaio por MTT, excluir o valor do branco antes.

	X	A				B				C			
		Leitura MTT (D.O.)				Title				Title			
	X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	C:Y1	C:Y2	C:Y3	C:Y4
1	44.00	0.015	0.021	0.024	0.020								
2	30.00	0.027	0.032	0.059	0.071								
3	22.00	0.205	0.189	0.517	0.514								
4	15.00	0.583	0.536	0.788	0.764								
5	11.00	0.693	0.596	0.780	0.767								
6	7.50	0.741	0.716	0.789	0.760								
7	5.50	0.760	0.667	0.771	0.772								
8	0.55	0.745	0.709	0.622	0.635								
9													
10													
11													
12													
13													
14													
15													
16													
17													
18													
19													
20													
21													
22													
23													

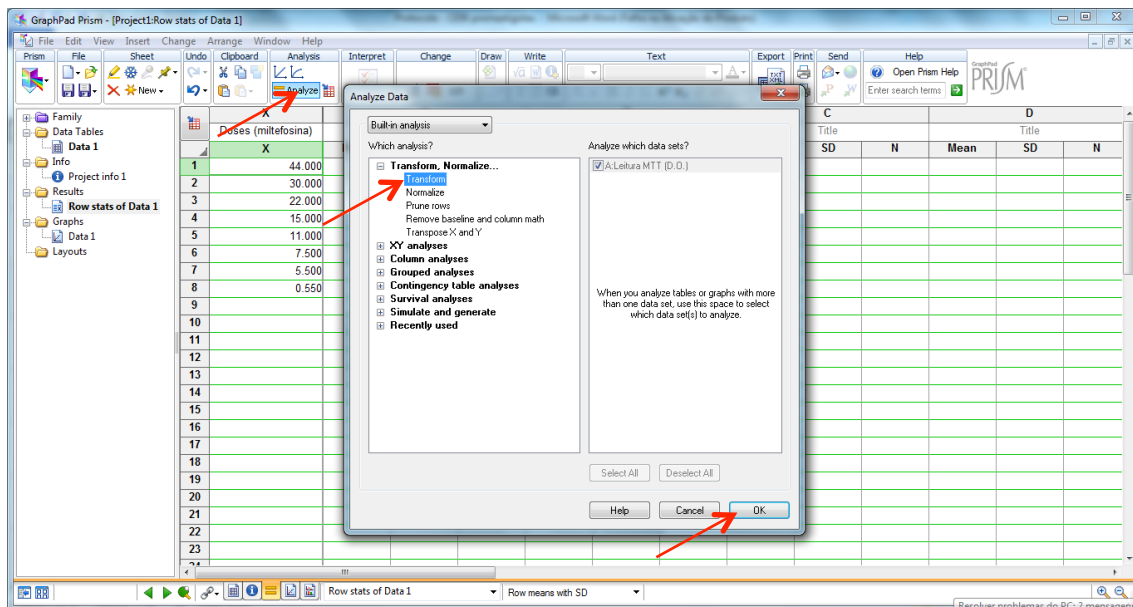
Para fazer a média das triplicatas:



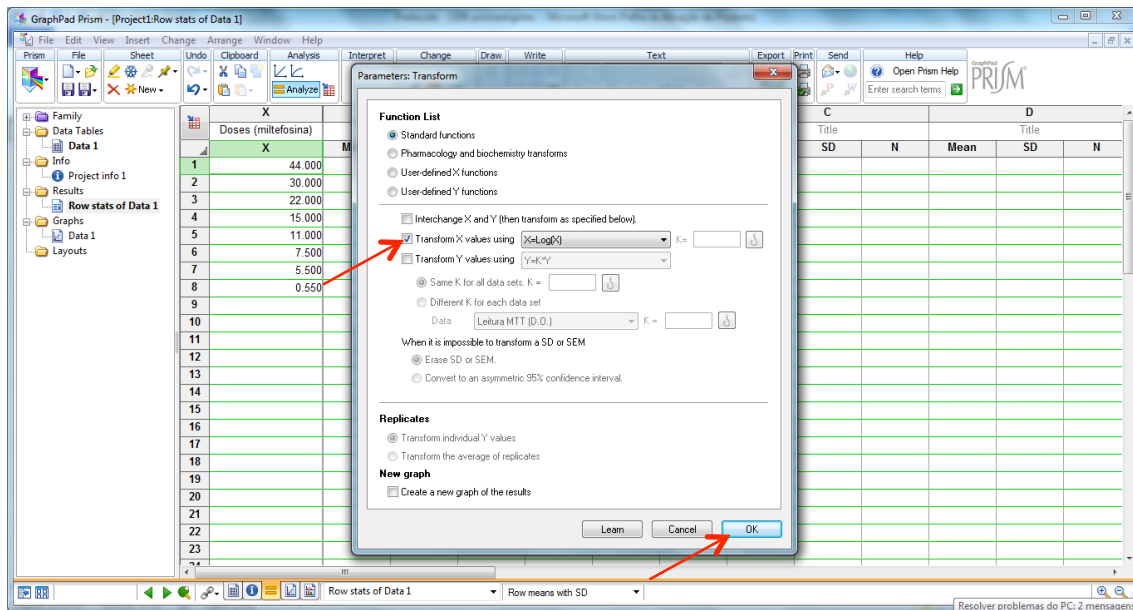
Em seguida:



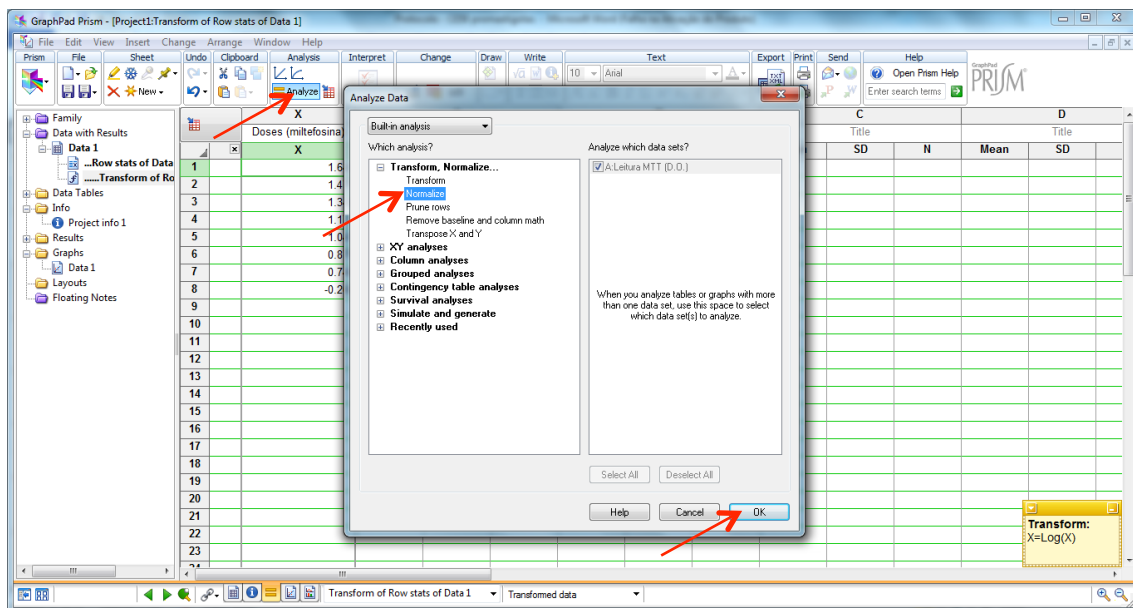
Para transformar os valores em log:



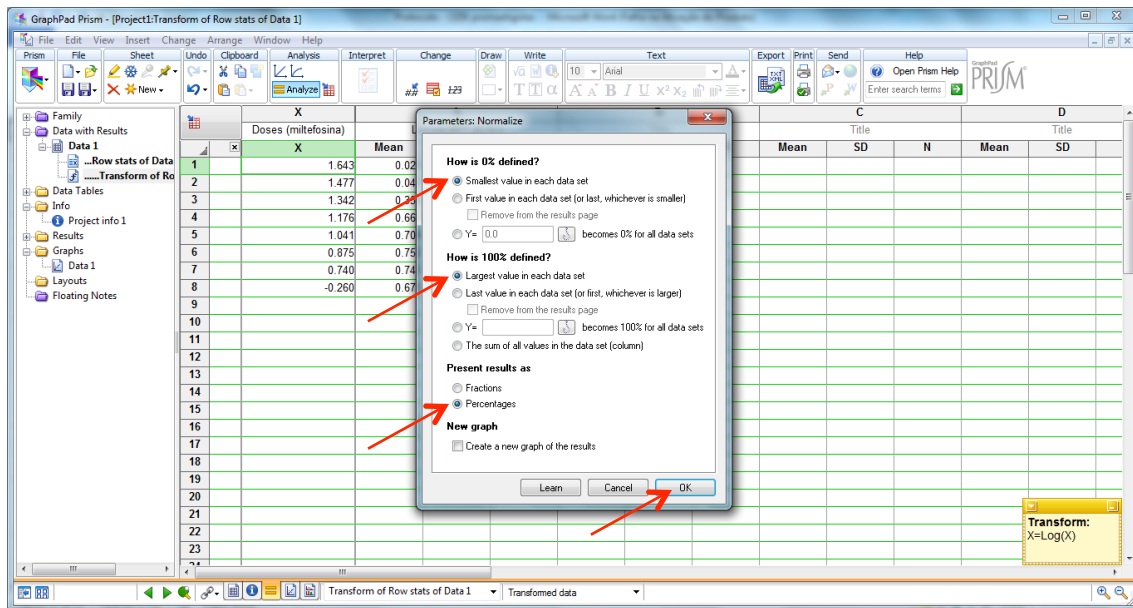
Em seguida:



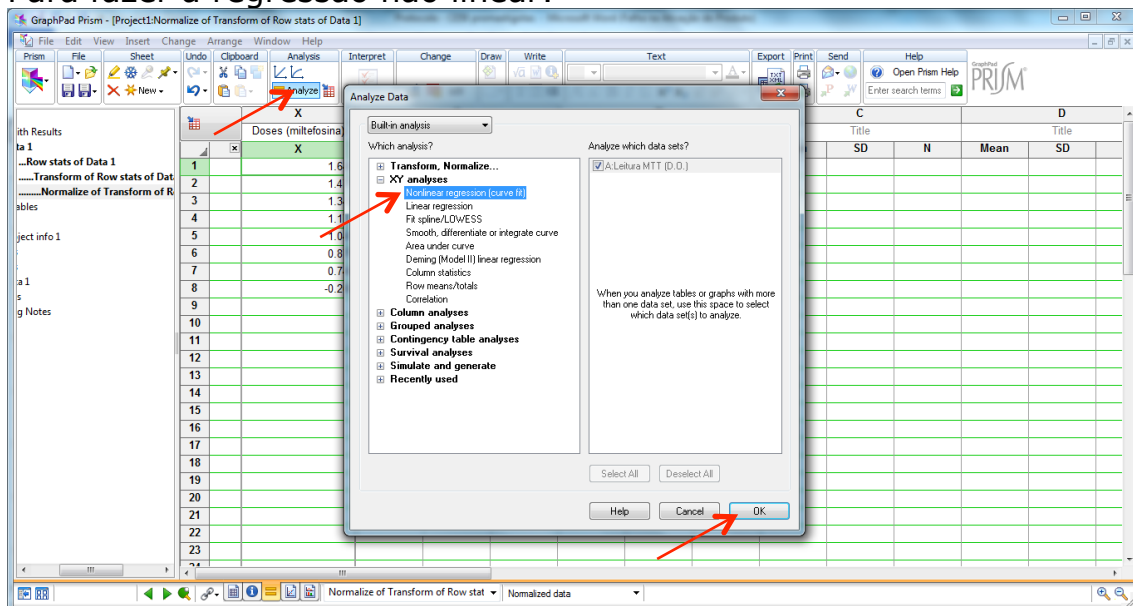
Para normalizar os valores de acordo com o controle não tratado:



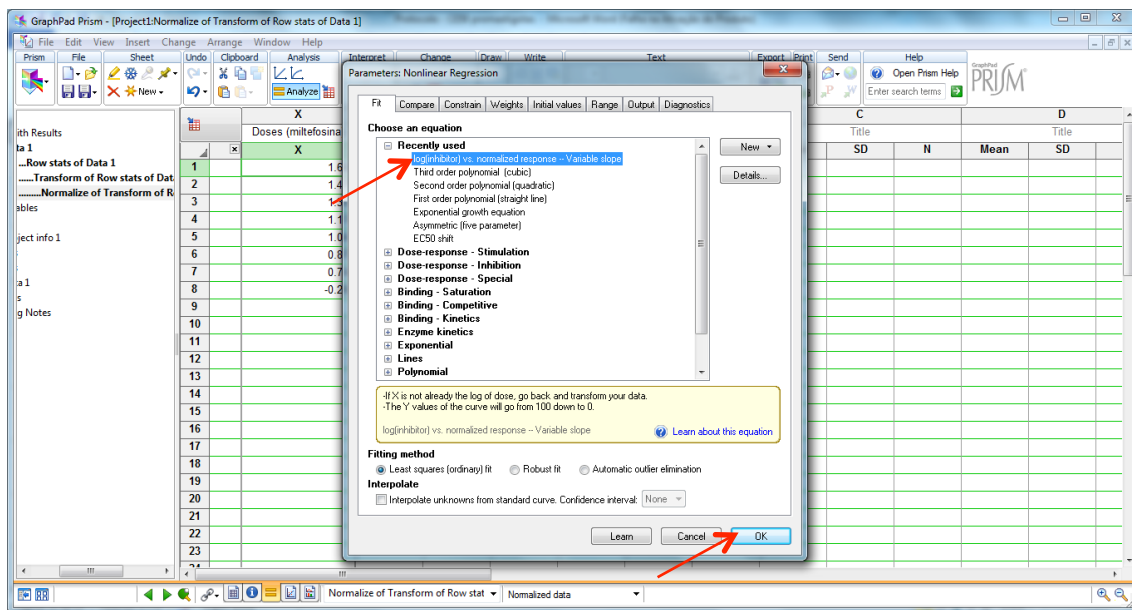
Em seguida:



Para fazer a regressão não linear:



Em seguida:

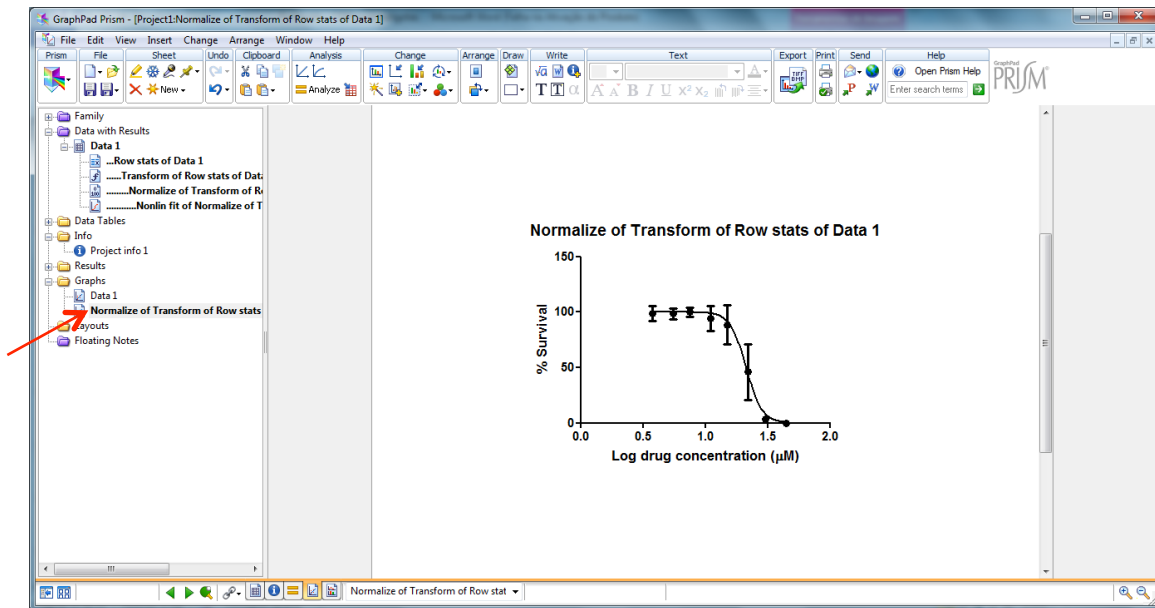


Para ver o resultado de CE_{50} e $IC_{95\%}$:

GraphPad Prism - [Project1: Nonlin fit of Normalize of Transform of Row stats of Data 1]

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
	Leitura MTT (D.O.)	Title	Title	Title	Title	Title	Title	Title	Title
1	log(inhibitor) vs. normalized response - Variable slope	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
2	Best-fit values								
3	LOGIC50	1.325							
4	HILLSLOPE	-6.801							
5	IC50	21.15							
6	Std. Error								
7	LOGIC50	0.01438							
8	HILLSLOPE	1.487							
9	95% Confidence Intervals								
10	LOGIC50	1.296 to 1.355							
11	HILLSLOPE	-9.837 to -3.764							
12	IC50	19.77 to 22.63							
13	Goodness of Fit								
14	Degrees of Freedom	30							
15	R ²	0.9218							
16	Absolute Sum of Squares	4266							
17	Sy.x	11.92							
18	Number of points								
19	Analyzed	32							
20									
21									
22									
23									

Para ver a curva de CE_{50} :



AULA PRÁTICA 2- 25/05/2015

Grupo: _____

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

6. _____

Fármaco: () miltefosina () anfotericina B () raloxifeno
() tamoxifeno () pentamidina () sitamaquina

Ensaio de MTT

Com base nos dados fornecidos para seu fármaco, construa um gráfico de histograma (média e desvio padrão) mostrando a % de viabilidade em cada concentração de fármaco. A viabilidade 100% corresponde ao número de células no poço sem tratamento, portanto as demais % devem ser calculadas com base na média de células na condição sem tratamento.

Cálculo de CE₅₀

Com base nos valores fornecidos, construa a curva sigmoidal e calcule o valor de CE₅₀ para seu fármaco.

Observação de tripanossomatídeos não patogênicos ao homem

Após análise ao microscópio, desenhe as formas observadas para cada cultura, anotando o aumento usado (objetiva e ocular).