Roteiro de aula prática Ensaio de sensibilidade de *Leishmania braziliensis* a fármacos

Parasita: promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *braziliensis.* Isolados clínicos recuperados de pacientes com leishmaniose cutânea e a cepa referência MHOM/BR/1975/2903.

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

B. Ensaio

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

Foram então adicionados a cada poço 100 μ L de promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária, ressuspensos em meio M199 para 2×10⁶células/mL. As placas contendo os parasitas em presença dos fármacos foram mantidas em estufa a 25 °C por 24 h.

Ensaio de MTT

A viabilidade celular foi avaliada por MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide). 30 μ L 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 50 μ L de 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) por poço.

Para a determinação da densidade óptica (DO), a absorbância dos poços foi determinada nos comprimentos de onda de 595 e 690 nm.

Nas tabelas se encontram os valores de DO obtidos em experimentos previamente realizados no laboratório. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração.

Além disso, temos também o valor do branco (apenas meio de cultura, sem parasitas ou fármaco), o qual deve sempre ser descontado dos valores de DO medidos, a fim de excluir a influencia da coloração do meio de cultura no experimento.

Lembrando que os valores de DO dos parasitas sem droga serão considerados como o 100% de sobrevivência (ou 0% de morte), já a maior concentração de fármaco pode ou não ser o 0% de sobrevivência (ou 100% de morte), vai depender do seu fármaco e do seu parasita.

ATIVIDADE:

Cálculo da Concentração efetiva 50% (CE₅₀)

A CE₅₀ será determinada a partir de curvas de regressão sigmoidal feitas no programa Graph Pad Prism 7.0, 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 crescente e as DOs ou porcentagens nas demais (A:Y1, A:Y2 e A:Y3).

No controle não tratado, digitar um valor de concentração pelo menos 10 vezes menor do que a menor concentração usada. Isso porque teremos que calcular o Log das concentrações, e não existe log de zero. **Observação: Quando for usar os valores de D.O. do ensaio por MTT, excluir o valor do branco antes.**

| 🛕 GraphPad Prism 7.03 - [Project1 | GraphPad Prism 7.03 - [Project1:Data 1] | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------------|---------|-------------------------------|---------|----------------|-----------|----------|------------|-----------------|--------|---------|-----------|--------|---------|------|--------|---------|
| le Edit View Insert Ch | ange | Arrange | e Family Windov | w Help | | | | | | | | | | | | | - 8 × |
| Prism File Sheet | Undo | Clipbo | ard Analysis | Ch | ange | Import Dr | aw Write | | Text | | Export | Print Sen | d LA H | elp | - | | |
| 🔥 🛝 🗋 - 🚯 🖉 - 🛞 📌 - | 61- | X 🗈 | E KR | 돌릴 | 💔 - 🔗 - 🛛 | | √a 📝 | Q | | Ŧ | A - R | 3 🔊 | | DDI | N/° | | |
| 🎿 🔒 🔂 - 🗙 🔆 New - | ₽- | 66 | Analyze 1 | * 🖬 🛲 | 🗉 ±23 🍼 - | | - T T | αAA | B I ∐ x² | X2 👘 🖷 | =· 🕬 | 🛃 "P | × 2- 🤇 | • | IVI | | |
| m Eamily | 6 | . 1 | × | 1 | Group A | | 1 | Group B | | | Group C | 1 1 | | Group D | | 1 | Group E |
| Search results | Table | format | Poses Mitefosioa (uM) | | itura MTT (D.O | 1) | | Title | | | Title | | | Title | | | Title |
| | | | X | A:Y1 | A:Y2 | A:Y3 | B:Y1 | B:Y2 | B:Y3 | C:Y1 | C:Y2 | C:Y3 | D:Y1 | D:Y2 | D:Y3 | E:Y1 | E:Y2 |
| Data 1 | | | 0.01 | 1 1 107 | 1.075000 | 1 15500 | 0 | | | | | | | | | | |
| 🖶 🕕 Info | 2 | Title | 1.60 | 1.107 | 0.969000 | 1.02800 | 0 | - | | | | | | | | | |
| Project info 1 | 3 | Title | 3.00 | 1.020 | 0.926000 | 0.96000 | č | | | | | | | | | | |
| | 4 | Title | 6.30 | 0.973 | 0.948000 | 0.91600 | Č | _ | | | | | | | | | E |
| Graphs | 5 | Title | 13.00 | 0.784 | 0.819000 | 0.87600 | 0 | - | | | | | | | | | |
| Data 1 | 6 | Title | 25.00 | 0.704 | 0.415000 | 0.38700 | 0 | | | | | | | | | | |
| | 7 | Title | 50.00 | 0.043 | 0.056000 | 0.04900 | 0 | | | | | | | | | | |
| | 8 | Title | 100.00 | 0.024 | 0.026267 | 0.02666 | 7 | | | | | | | | | | |
| | 9 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 11 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 12 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 13 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 14 | Title | | | _ | | | | | | | | | | | | |
| | 15 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 16 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 17 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 18 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 19 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 20 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 21 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 22 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 23 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 24 | Title | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 25 | Title | | | | | | | | | | | | | | | - |
| | • | | | | | | | | | | | | | | | | F. |
| | • | A | و 📄 💼 جي | | Data 1 | | | • F | tow 1, Column F | ιτ | | | | | | Q - [- | • |



| A GraphPad Prism 7.03 - [Project1 | :Data 1 | 1] | 40° 512 | | | | | | | | | | | | | | | | o x | : |
|-----------------------------------|---------|-----------|----------------------|---------|-------|-------------|----------|---------|-----------------|--------------|----------------------|----------|---------|--------------|-----------|---------|------|------|---------|-----|
| A File Edit View Insert Ch | ange | Arrang | e Family Windo | w Help | | | | | | | | | | | | | | | - 6 | × |
| Prism File Sheet | Undo | Clipbo | ard Analysis | - | Chan | ge | Import 0 | Draw | Write | | Text | | Expo | rt Print Sen | Id LA H | elp | - | | | |
| 🔥 🛝 🗋 - 📴 🖉 - 🛞 🖈 - | 61- | X 🖞 | | 3 | 📑 X | - 🖄- | | | √a 📝 🕄 | | | - | | 1 🗟 🔎 | () | DDI | N° . | | | |
| 🙈 🛛 🖓 - 🗙 🔆 New - | ₽- | 00 | - Analyze | * 🖬 | ## 🗷 | 123 🍼 - | | | TIα | A A | B I ∐ x ^a | ² X2 👘 🏢 | • 🖻 • 🖷 | • 🚭 📲 | 2 2- 0 | | 141 | | | |
| 🕀 🔄 Family | Table | e format: | x | | | Group A | | | | Group B | | | Group C | | | Group D | | | Group E | E 🔺 |
| | | XY | Doses Mitefosina (µA | 1) | Leitu | ra MTT (D.C | 0.) | | | Title | | | Title | | | Title | | | Title | |
| Data Tables | | × | х | A:Y1 | 1 | A:Y2 | A:Y3 | | B:Y1 | B:Y2 | B:Y3 | C:Y1 | C:Y2 | C:Y3 | D:Y1 | D:Y2 | D:Y3 | E:Y1 | E:Y2 | |
| Data 1 | 1 | | 0.0 | 01 1 | 1.107 | 1.075000 | 6 | | | | | x | | | | | | | | |
| | 2 | Title | 1.6 | 50 1 | 1.025 | 0.969000 | Parame | ters: I | (ow means | with SD of | SEM | | | | | | | | | |
| Project into 1 | 3 | Title | 3.0 | 0 1 | 1.029 | 0.926000 | | | | | | | | | | | | | | - |
| Graphs | 4 | Title | 6.3 | 30 0 | 0.973 | 0.948000 | Sc | ope o | f calculatio | ns | | | | | | | | | | - = |
| Data 1 | 5 | Title | 13.0 | 0 0 | 0.784 | 0.819000 | | Calc | culate one tot | al/mean for | entire data table | | | | | | | | | |
| Layouts | 6 | Title | 25.0 | 0 0 | 0.340 | 0.415000 | | Calo | culate a total/ | mean for e | ach data set. | | | | | | | | | |
| - | 7 | Title | 50.0 | 0 0 | 0.043 | 0.056000 | Cal | lculat | e | | | | | | | | | | | |
| | 8 | Title | 100.0 | 0 0 | 0.024 | 0.026267 | | Rov | v totals | | | | | | | | | | | |
| | 9 | Title | | | | | | 🔵 Rov | v means | | | | | | | | | | | |
| | 10 | Title | | | | | | Rov | v means with | SD | | | | | | | | | | |
| | 11 | Title | | | | | | Rov | v means with | SEM | | | | | | | | | | |
| | 12 | Title | | | | | | Rov | v means with | %CV | | | | | | | | | | |
| | 13 | Title | | | | | | Rov | v medians wit | h range | | | | | | | | | | |
| | 14 | Title | | | | | Ne | w ora | ph | | | | | | | | | | | |
| | 15 | Title | | | | _ | | Crea | ate a new gra | oh of the re | veulte | | | | | | | | | |
| | 16 | Title | | | | | | | are a non gra | | | | | | | | | | | |
| | 17 | Title | | | | | | _ | | | | | | | | | | | | |
| | 18 | Title | | | | | | | Learn | Cancel | OK | | | | | | | | | |
| | 19 | Title | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| | 20 | Title | | | | | _ | | _ | | | _ | | | | | | | | |
| | 21 | Title | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 22 | Title | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 23 | Title | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 24 | Title | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 25 | Title | | | | | | | | | | | | | | | | | | - |
| | • | | | | | | | | | | | | | | | | | | Þ | 1 |
| | • | N S | 0 ا ا | = [🖬] | | Data 1 | | | | • | Row 1, Column R | श | | | | | | Q | | Q, |

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



| 🛕 GraphPad Prism 7.03 - [Project1 | Row st | ats of | Data 1] | | | | - | 11.1 Page Barriel Barriel | | | | | - | 0 X |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------|------------------------|-----------|-----------------|--------|----|---------------------------------------------------------------|----|---------|-----------|---|-------|-------|
| A File Edit View Insert Ch | ange | Arran | ge Family Window | Help | | | | | | | | | | - 8 × |
| Prism File Sheet | Undo | Clipb | oard Analysis | Interpret | Change | Draw | Wr | rite Text Export Print Send | d | LA Help | Graphia C | | | |
| <u>∧</u> . <u>□</u> · <u>□</u> · <u>□</u> · <u>□</u> · <u>⊘</u> · ⊘ | 61- | 26 4 | A KKR | | 4 | »- | 1 | | 0 | | PRIA | 1 | | |
| | 5- | | Analyze | × 💷 | ## 😨 ł | 23 🗌 - | Pa | arameters: Normalize | 24 | &- Ø- | TIM | 1 | | |
| Family | | | X | | A | 1 | | | T. | | D | | 1 | E . |
| | | | Doses Miltefosina (µM) | Le | tura MTT (D.O.) | | | Subcolumns | | | Title | | | Title |
| Data Tables | | × | X | Mean | SD | N | | Average the subcolumns, and normalize the means | | Mean | SD | N | Mean | SD |
| Data 1 | 1 | | 0.010 | 1.112 | 0.040 | 3 | | Normalize each subcolumn separately | | | | | | |
| | 2 | | 1.600 | 1.007 | 0.033 | 3 | | How is 0% defined? | | | | | | |
| Project into 1 | 3 | | 3.000 | 0.972 | 0.052 | 3 | | Smallert value in each data cet | | | | | | |
| Row stats of Data 1 | 4 | | 6.300 | 0.946 | 0.029 | 3 | | First uship in each data set (or last ushipbour is consiling) | | | | | | |
| Graphs | 5 | | 13.000 | 0.826 | 0.046 | 3 | | Remove from the results page | | | | | | |
| Data 1 | 6 | | 25.000 | 0.381 | 0.038 | 3 | | Henrove non the results page | | | | | | |
| Row stats of Data 1 | 7 | | 50.000 | 0.049 | 0.007 | 3 | | Decomes U% for all data sets | | | | | | |
| Layouts | 8 | | 100.000 | 0.026 | 0.001 | 3 | | How is 100% defined? | | | | | | |
| | 9 | | | | | | | Largest value in each data set | | | | | | |
| | 10 | | | | | | 2 | Last value in each data set (or first, whichever is larger) | | | | | | |
| | 11 | | | | | | | Remove from the results page | | | | | | |
| | 12 | | | | | | | Y= becomes 100% for all data sets | | | | | | |
| | 13 | | | | | | | The sum of all values in the data set (column) | | | | | | |
| | 14 | | | - | | - | | | | | | | | |
| | 15 | | | | | | | Present results as | | | | | | |
| | 16 | | | - | | | | Fractions | | | | | | |
| | 17 | | | | | | | Percentages | | | | | | |
| | 18 | | | | | | | New graph | | | | | | |
| | 19 | | | | | | | Create a new graph of the results | | | | | | |
| | 20 | | | | | | | | | | | | | |
| | 21 | | | | | | | | | | | | | |
| | 22 | | | | | | | Learn Cancel OK | | | | | | |
| | 23 | | | | | | Ľ | | | | | | | |
| | 24 | | | | | | | | | | | | | |
| | 25 | | | | | | | | | | | | | + |
| | 4 | | | | | | | | | | | | | + |
| | • | м | ۵ 🖻 | | Row stats of D | ata 1 | _ | ✓ Row means with SD ▼ | | | | | Q -0- | • |

Para transformar os valores em Log(X):



| 🛕 Grap | hPad Prism 7.03 - [Project1 | Norma | lize of Row stats of Data 1] | | an Annahanan a an | | 3 X |
|----------|-----------------------------|----------|------------------------------|--------|----------------------------------------------------------|------|-------|
| 🔌 File | e Edit View Insert Ch | ange | Arrange Family Windo | v Help | | | - 5 × |
| Prism | File Sheet | Undo | Clipboard Analysis | Int | erpret Change Draw Write Text Export Print Send LA Help | | |
| A | 🗋 - 🚯 🖉 - 🏵 🖈 - | 61- | XGT LER | C | | | |
| | 🕞 🕞 - 🗙 🔆 New - | ₽- | 🖺 👘 - 🗧 Analyze | * | | | |
| | amile. | l l | | | | 1 | E i |
| | earch results | 1 | Deses Hillefeeine (vill | | Function List | | Talla |
| | Data with Results | | | | Standard functions N Mean SD N | Mean | sn |
| 1 6- | Data 1 | | | | Pharmacology and biochemistry transforms | mean | |
| | Row stats of Data | 1 | 0.01 | | | + | |
| | | 2 | 1.60 | 1 | | + | |
| 🖕 📑 🚺 | Data Tables | 3 | 3.00 | 1 | User-defined Y functions | + | E |
| 🖨 - 🚺 I | nfo | - | 6.30 | | Interchange X and Y (then transform as specified below). | ++ | |
| | Project info 1 | 0 | 13.00 | | | ++ | |
| 🕀 - 🛄 🖡 | Results | 0 | 25.00 | | | + | |
| | Braphs | <u> </u> | 50.00 | | Transform Y values using Y=KY - | + | |
| | Bow state of Data 1 | 8 | 100.00 | | Same K for all data sets. K = | + | |
| | Normalize of Row stats | 9 | | | Different K for each data set | + | |
| | avouts | 10 | | | | + | |
| F | loating Notes | 11 | | | | + | |
| - | - | 12 | | | When it is impossible to transform a SD or SEM | | |
| | | 13 | | | Erase SD or SEM. | | |
| | | 14 | | | Convert to an asymmetric 95% confidence interval. | | |
| | | 15 | | | | | |
| | | 16 | | | Residentes | | |
| | | 17 | | | ineplicates | | |
| | | 18 | | | Iranstorm individual Y values | | |
| | | 19 | | | Transform the average of replicates | | |
| | | 20 | | | New graph | | |
| | | 21 | | | Create a new graph of the results | | |
| | | 22 | | | | | |
| | | 23 | | | Learn Carcel OK | | |
| | | 24 | | | | | |
| | | 25 | | | | | |
| • | III F | • | | | | | E F |
| F | | • | M 🔗 🗎 🚺 | | Mormalize of Row stats of Data 1 | Q | € |

Para fazer a regressão não linear:



| 🛕 GraphPad Prism 7.03 - [Project1:T | Transfor | rm of Normalize of R | ow stats of | of Da | a 1] | | | | | | | |
|----------------------------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|--------------------|-------|-------|----|----------|-------|
| 👻 File Edit View Insert Cha | inge / | Arrange Family V | Vindow H | Help | | | | | | | | - 8 × |
| Prism File Sheet | Undo | Clipboard An | alysis | 1 | erpret Change Draw Write Text Export | Print | Send | LA He | IP | | | |
| ▲ □- ⓑ ∠- ↔ ≠- | ⊂ ∠ | | ₽ <u>.</u> ze ₩ ₩ | Par | meters: Nonlinear Regression | × 6 | Э- 6 Р 3 | 2- 0 | PRIM | ſ | | |
| | | | | | Fit Compare Constrain Weights Initial values Range Output Confidence Diagnostics Flag | , | - | | D | | 1 | E A |
| results | Ì | Denes Mitofosi | a (ult) | | Choose an equation | | | | Title | | | Tèle |
| ith Results | | v v | in (um) | | Becently used | | - | Mean | sn | N | Mean | SD |
| ta 1 | | <u> </u> | 0.000 | | log(inhibitor) vs. normalized response Variable slope | - E | | moun | | | incuit | |
| Row stats of Data 1 | 2 | | -2.000 | | Sigmoidal dose-response (variable slope) Details | | _ | | | | | |
| Normalize of Row stats of Data | 2 | | 0.204 | | log[agonist] vs. response Find ECanything | | _ | | | | | |
| Transform of Normalize of Ro | 3 | | 0.477 | | Sigmoidal dose-response (Variable stope) [2] Michaelis-Menten | | _ | | | | | Ξ. |
| ables | 4 | | 0.799 | | One phase decay | | | | | | | |
| | 5 | | 1.114 | | User-defined equations | | | | | | | |
| ject info 1 | 6 | | 1.398 | | Standard curves to interpolate | | | | | | | |
| | 7 | | 1.699 | | Dose-response - Stimulation | | | | | | | |
| | 8 | | 2.000 | | Dose-response - Inhibition Dese-response - Special | | | | | | | |
| al | 9 | | | | Binding - Saturation | | | | | | | |
| w stats of Data 1 | 10 | | | | Binding - Competitive | | | | | | | |
| rmalize of Row stats of Data 1 | 11 | | | | Binding - Kinetics | | | | | | | |
| nsform of Normalize of Kow stats | 12 | | | | Enzyme kinetics - Inhibition | | | | | | | |
| s n Notos | 13 | | | | Enzyme kinetics - Subtrate vs. Velocity | | | | | | | |
| givotes | 14 | | - 11 | | | | | | | | | |
| | 15 | | | | - D | | | | | | | |
| | 16 | | - 11 | | If you subtracted off the baseline, constrain Bottom to a constant value of 0.0. If you normalized your | | | | | | | |
| | 17 | | _ | | data, also cosntrain Top to 100.0 | | | | | | | |
| | 18 | | - 11 | | Sigmoidal dose-response (variable slope) | | | | | | | |
| | 19 | | - 11 | | | | | | | | | |
| | 20 | | - 11 | | Fitting method | | | | | | | |
| | 21 | | - 10 | | O Least squares (ordinary) ht Bobust ht Automatic outlier elimination | | - | | | _ | | |
| | 22 | | | | Interpolate | | - | | | | | |
| | 22 | | | | Interpolate unknowns from standard curve. Confidence interval: None | | - | | | T | ansform: | |
| | 23 | | | | | _ - | - | | | X= | Log(X) | |
| | 24 | | _ | | Learn Canog OK | | | | | | | |
| | 25 | | | L | | | | | | | | - |
| < III + | • | | | | | _ | | | | | | P. |
| I II I I I I I I I I I I I I I I I I I | • | M & . | 0 = [| K | Transform of Normalize of Row stats of Data 1 👻 Transformed data 💌 | | | | | | Q - J- | • |

Para ver o resultado de CE₅₀ e IC95%:



Para ver o gráfico:



Olhem atentamente para o gráfico, percebam a distribuição dos pontos ao longo da curva, essa curva está boa?

Agora olhem a janela na qual foi calculada a média dos valores e desvio padrão, qual concentração equivale à EC50 (DO seria metade do valor do não tratado)? Isso bate com os dados calculados no progama?

Ρ

Para calcular a CE₉₀:

Primeiramente retornar à aba da transformação para Log(X) para o programa saber que é em cima destes dados que fará a nova análise.



Em seguida:

Encontrar a opção "FindECanything" que como o nome sugere, te permite encontrar qualquer EC.



O programa te pedirá um valor de F. Se você quer achar a EC₉₀ você deverá preencher esse valor com o número 10. Isso porque o programa lê esse F como porcentagem de sobrevivência, logo se você quer encontrar a concentração que mata 90% dos parasitas (10% sobrevivem) você deve preencher o valor de F com 10.

| A GraphPad Prism 7.03 - [Project1:Transform of N | ormalize of Row stats of Da | Pata 1] | |
|--------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| le Edit View Insert Change Arrange | Family Window Help | lp | _ 8 × |
| Prism File Sheet Undo Clipbos | ard Analysis | Interpret Change Draw Write Text Export Print Send LA Help | |
| 🛛 🔥 🖸 - 🚯 🖉 - 🏶 🖈 - 🍽 - 🐰 🗋 | | arameters: Nonlinear Regression | |
| – 🍊 💭 - 🗙 🔆 New - 🗳 - 🗈 🗈 | - 🔚 Analyze 🔠 🔆 🔤 | | |
| | | Fit Compare Constrain Weights Initial values Range Output Confidence Diagnostics Flag | |
| - Family | 1 | Presenter Manage Constraint Tune Vision Hack | ^ |
| | Doses Milt | radinicel value rock | |
| Data With Results | × | No constraint V SU N Mean SU | N Mean |
| Bow stats of Data 1 | | HillSlope No constraint | |
| Normalize of Row stats of Data 1 | 2 | F Constant agriculture and 10 | |
| - 🚰 Transform of Normalize of Row | 3 | | E |
| Nonlin fit of Transform of Nor | 4 | Bottom No constraint | |
| 8 | 5 | Top No constraint | |
| - 🕕 Info | 6 | | |
| Project info 1 | 7 | | |
| | 8 | | |
| Graphs | 9 | Ele entende F como | |
| Bow state of Data 1 | 10 | | |
| Normalize of Row stats of Data 1 | 11 | "porcentagem de | |
| Transform of Normalize of Row stats of | 12 | | |
| | 13 | sobrevivência" por isso | |
| | 14 | | |
| | 15 | usamos 10 ao invés do 90 | |
| | 16 | | |
| | 17 | | |
| | 18 | | |
| | 19 | Constrain one parameter relative to another | |
| | 20 | must be greater than 1 times | |
| | 21 | must be greater than 1 times | |
| | 22 | Transf | form: |
| | 23 | X=Log | (X) |
| | 24 | Learn Cancel OK | |
| | 25 | | - |
| ۰ III + | 1 | | Þ |
| 📧 📰 🛛 🕹 🖌 🖌 🖉 | 🖬 🖬 📲 | Transform of Normalize of Row stats of Data 1 🗸 Transformed data 🔹 | - I • |

• Atenção: É sempre muito importante ver se os valores que o programa te deu fazem sentido. Não tem como, por exemplo, seu valor de EC₉₀ ser menor que o de EC₅₀ em uma curva dose resposta. Analise sempre criticamente os resultados do programa.

Para ver o resultado:

O programa chamará a EC que você quis calcular de ECF. Você verá que não apareceu um novo gráfico, isso porque é a mesma regressão, você só pediu para ele te mostrar um ponto diferente do gráfico.

| Prism Image Sheet Undo Clipba Image Image Sheet Undo Clipba Image Image Image Image Image Image Image Image | rd | Analyze Analyz | Draw | Write √a ₪ ❹ [T] α | ĂĂBI | Text ∐ X ² X ₂ ⊯ 1 | ► A + | Print Send | LA Help | RIM | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------------------------|-------|---------------------------------------------|-------|------------|---------|-------|-------|-------|
| | - | Nonlin 6t | | Α | В | C | D | E | F | G | H | 1 |
| sults | | Nomin IK | Leitu | ra MTT (D.O.) | Title | Title | Title | Title | Title | Title | Title | Title |
| 1 | 1 | 6 | | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| Row stats of Data 1 | 1 | log(agonist) vs. response Find ECanything | | | | | | | | | | |
| Normalize of Row stats of Data 1 | 2 | Best-fit values | | | | | | | | | | |
| Transform of Normalize of Row stats of Dat | 3 | logECF | 1.648 | 8) | | | | | | | | 1 |
| Nonlin fit of Transform of Normalize of Row | 4 | HillSlope | -2.9 | | | | | | | | | |
| Nonlin fit of Transform of Normalize of Re | 5 | F | = 10 | | | | | | | | | |
| • | 6 | Bottom | -2.652 | | | | | | | | | |
| ct info 1 | 7 | Тор | 91.58 | | | | | | | | | |
| | 8 | ECF | 44.5 | | | | | | | | | |
| | | Span | 94.24 | | | | | | | | | |
| 1 🗸 | 10 | Std. Error | | | | | | | | | | |
| stats of Data 1 | 11 | logECF | 0.050 | 36 | | | | | | | | |
| halize of Row stats of Data 1 | 12 | HillSlope | 0.364 | 3 | | | | | | | | |
| form of Normalize of Now stats of Data 1 | 13 | Bottom | 2.912 | | | | | | | | | |
| Notes | 14 | Тор | 1.607 | () | - | | | | | | | |
| | 15 | Span | 3.539 | | | | | | | | | |
| | 16 | 95% CI (profile likelihood) | | | | | | | | | | |
| | 17 | logECF | 1.556 | to 1.782 | | | | | | | | |
| | 18 | HillSlope | -3.875 | to -2.154 | | | | | | | | |
| | 19 | Bottom | -9.568 | to 2.999 | | | | | | | | |
| | 20 | Тор | 88.19 | to 95.17 | | | | | | | | |
| | 21 | ECF | 35.95 | to 60.53 | | | | | | | | |
| | 1 | Goodness of Fit | | | | | | | | | | |
| | 23 | Degrees of Freedom | 20 | | | | | | | - | | |
| · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | 24 | R square | 0.985 | 5 | | | | | | | | |
| III + | ٠ 📃 | | 111 | | | | | | | | | |

Para ver os dados obtidos em um formato diferente de gráfico, como o histograma:



Em seguida: Você deverá construir o seu histograma com base nos dados normalizados



Em seguida:

| 🚵 GraphPad Prism 7.03 - [Dados aula apresentados.pzfx:Transform of Normalize of Row stats of Data 1] | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| A File Edit View Insert Change Arrange Family Window Help | _ & × |
| Prism File. Sheet Undo Clipboard Analysis Change Arrange Draw Write Text | Export Print Send LA Help |
| | PRIM |
| nily Create New Graph rch results 7 | 11 15 18 18 17 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 19 |
| a with Results Data sets to plot | |
| Data 1 | |
| a lables | |
| Protect info 1 9 Plot selected data sets only Select | |
| Also plot associated curves | |
| phs TC Create a new graph for each data set (don't put them all on one graph) | |
| Data 1 Kind of graph | If Data 1 |
| Row stats of Data 1 | |
| Normalize of Row stats of Data 1 | |
| Transform of Normalize of Row stats of Data 1 | NAV |
| Normalize of Kow stats of Data I Leitura MIT (D.O | |
| ating Notes | |
| Interleaved bars Plot: Mean with SD | 3 |
| | |
| | |
| 16 Help Cancel OK | |
| | |
| | |
| | |
| 🔯 🔢 🔺 🖌 🤻 📓 🕘 🗮 🔛 📓 Transform of Normalize of Row stats of Data 1 🗸 | Q - Q 100% |

Para visualizar:



Anote os dados obtidos no word e exporte o gráfico, isso pode ser feito no botão da barra de tarefas do prisma indicado na figura acima. É possível brincar com as cores, preenchimento e legendas também. Caso queira modificar um gráfico que já está no word (que foi exportado clicando no botão indicado) basta clicar duas vezes nele. O prisma abrirá automaticamente e após fazer as alterações e fechar o programa sua imagem será alterada no próprio word!! ©

Os dados que vocês receberam são reais. Estes parasitas foram recuperados de pacientes com leishmaniose cutânea e possuem sensibilidades diferentes, principalmente à miltefosina. Vocês podem tentar comparar os dados obtidos com os demais grupos ou até mesmo fazer mais de um dado, caso tenham curiosidade.

AULA PRÁTICA - 13/06/2017



Ensaio de MTT

Com base nos dados fornecidos para seu(s) fármaco(s), 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.

() Isolado B – Anfotericina () Isolado C - Anfotericina

Cálculo de EC₅₀

Com base nos valores fornecidos, construa a curva sigmoidal e calcule o valor de EC₅₀ para seu fármaco.

Cálculo de EC₉₀

Com base nos valores fornecidos, construa a curva sigmoidal e calcule o valor de EC₉₀ para seu fármaco.

Discussão

Compare os resultados obtidos para as duas condições que seu grupo recebeu (diferentes isolados com um mesmo fármaco ou mesmo isolado com fármacos distintos) e discuta os motivos para as diferenças observadas, se houver.