

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 µL de meio M-199.

Foram então adicionados a cada poço 100 µL de promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária, ressuspensos em meio M199 para 2×10^6 células/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 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 50 µL 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.

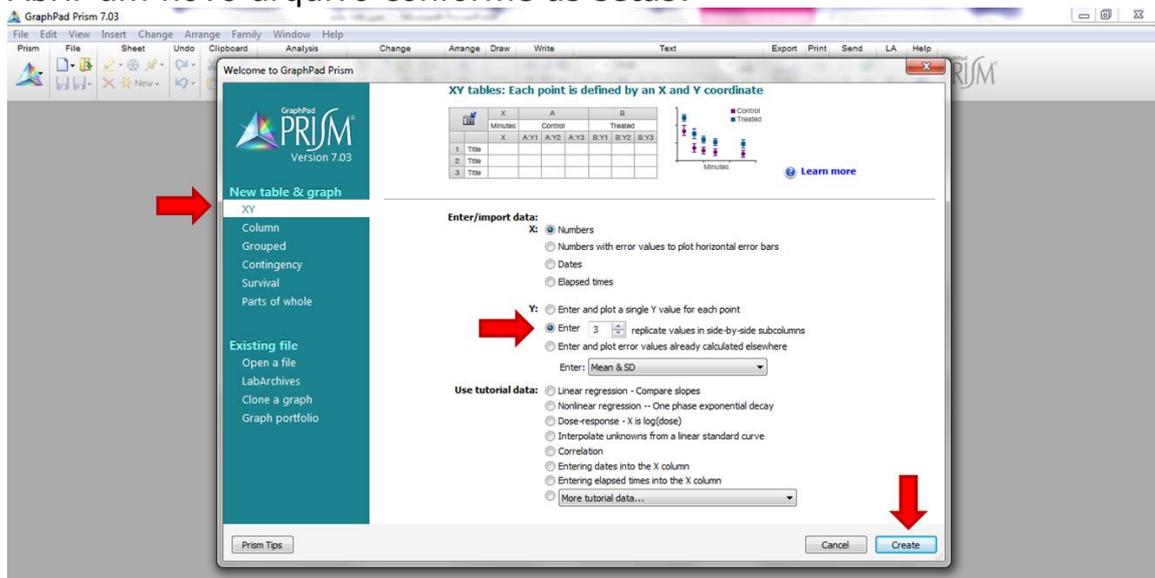
ATIVIDADE:

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:Data 1]

File Edit View Insert Change Arrange Family Window Help

Prism File Sheet Undo Clipboard Analysis Change Import Draw Write Text Export Print Send LA Help

Table format: XY

X	Group A			Group B			Group C			Group D			Group E		
	Doses Mifefosina (µM)	Letura MTT (D.O.)			Title			Title			Title			Title	
1	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
2	Title	0.01	1.107	1.075000	1.155000										
3	Title	1.60	1.025	0.969000	1.028000										
4	Title	3.00	1.029	0.926000	0.960000										
5	Title	6.30	0.973	0.948000	0.916000										
6	Title	13.00	0.784	0.819000	0.876000										
7	Title	25.00	0.340	0.415000	0.387000										
8	Title	50.00	0.043	0.056000	0.049000										
9	Title	100.00	0.024	0.026267	0.026667										
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														

Row 1, Column RT

Para fazer a média das triplicatas:

GraphPad Prism 7.03 - [Project1:Data 1]

File Edit View Insert Change Arrange Family Window Help

Prism File Sheet Undo Clipboard Analysis Change Import Draw Write Text Export Print Send LA Help

Table format: XY

X	Group A			Group B			Group C			Group D			Group E		
Doses Mifefosina (µM)	Letura MTT (D.O.)			Title			Title			Title			Title		
1	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
2	Title	0.01	1.107	1.075000	1.155000										
3	Title	1.60	1.025	0.969000	1.028000										
4	Title	3.00	1.029	0.926000	0.960000										
5	Title	6.30	0.973	0.948000	0.916000										
6	Title	13.00	0.784	0.819000	0.876000										
7	Title	25.00	0.340	0.415000	0.387000										
8	Title	50.00	0.043	0.056000	0.049000										
9	Title	100.00	0.024	0.026267	0.026667										
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														

Row 1, Column RT

Analyze Data

Which analysis?

- Transform, Normalize...
 - Transform
 - Transform Concentrations (X)
 - Normalize
 - Prune rows
 - Remove baseline and column math
 - Transpose X and Y
 - Fraction of total
- XY analyses
 - Nonlinear regression (curve fit)
 - Linear regression
 - Fit spline/LDWESS
 - Smooth, differentiate or integrate curve
 - Area under curve
 - Deming (Model II) linear regression
 - Column statistics
 - Row means with SD or SEM
 - Correlation
 - Interpolate a standard curve
- Column analyses
- Grouped analyses
- Contingency table analyses

Analyze which data sets?

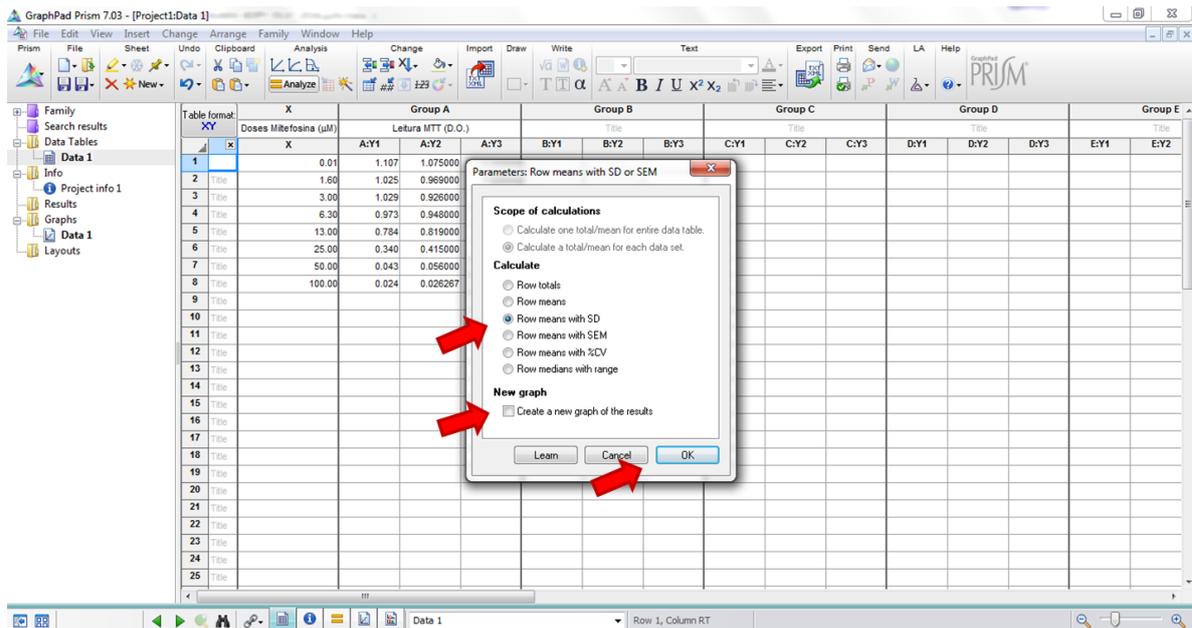
A:Letura MTT (D.O.)

When you analyze tables or graphs with more than one data set, use this space to select which data set(s) to analyze.

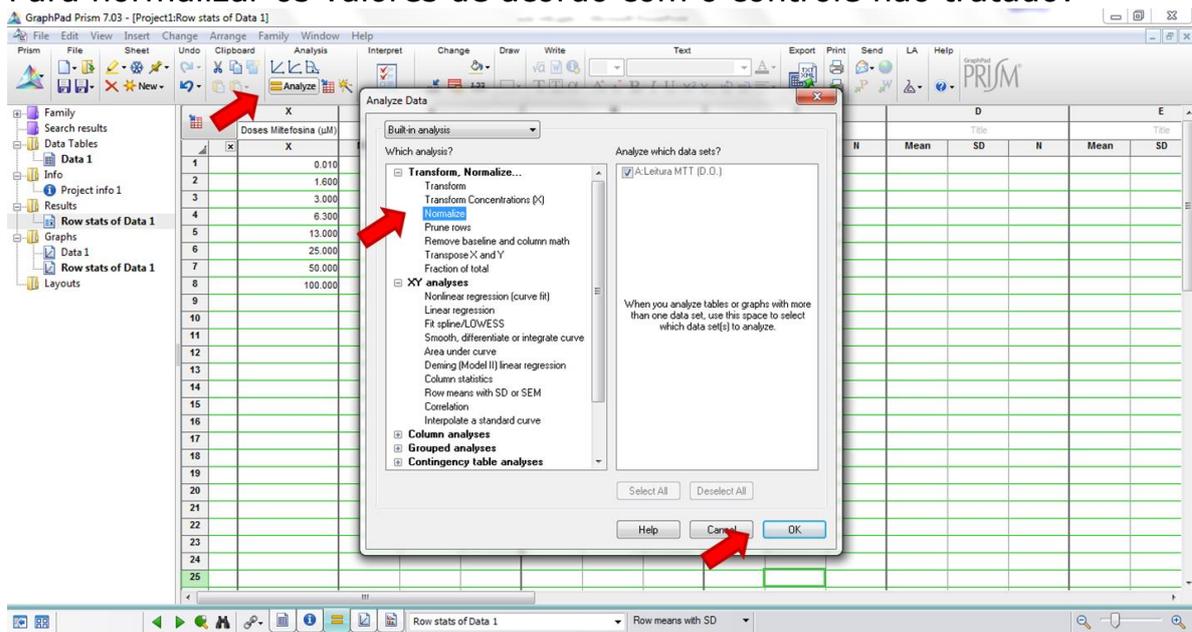
Select All Deselect All

Help Cancel OK

Em seguida:



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



Em seguida:

GraphPad Prism 7.03 - [Project]: Row stats of Data 1

Parameters: Normalize

Subcolumns

- Average the subcolumns, and normalize the means
- Normalize each subcolumn separately

How is 0% defined?

- Smallest value in each data set
- First value in each data set (or last, whichever is smaller)
- Remove from the results page
- Y= [] becomes 0% for all data sets

How is 100% defined?

- Largest value in each data set
- Last value in each data set (or first, whichever is larger)
- Remove from the results page
- Y= [] becomes 100% for all data sets
- The sum of all values in the data set (column)

Present results as

- Fractions
- Percentages

New graph

- Create a new graph of the results

Learn Cancel OK

Para transformar os valores em Log(X):

GraphPad Prism 7.03 - [Project]: Normalize of Row stats of Data 1

Analyze Data

Which analysis?

- Transform, Normalize...
 - Transform
 - Transform Concentrations (X)
 - Normalize
 - Prune rows
 - Remove baseline and column math
 - Transpose X and Y
 - Fraction of total
- XY analyses
 - Nonlinear regression (curve fit)
 - Linear regression
 - Fit spline/LDWESS
 - Smooth, differentiate or integrate curve
 - Area under curve
 - Deming (Model II) linear regression
 - Column statistics
 - Row means with SD or SEM
 - Correlation
 - Interpolate a standard curve
- Column analyses
- Grouped analyses
- Contingency table analyses

Analyze which data sets?

- A: Letura MTT (D.O.)

When you analyze tables or graphs with more than one data set, use this space to select which data set(s) to analyze.

Select All Deselect All

Help Cancel OK

Em seguida:

GraphPad Prism 7.03 - [Project1:Normalize of Row stats of Data 1]

Parameters: Transform

Function List

- Standard functions
- Pharmacology and biochemistry transforms
- User-defined X functions
- User-defined Y functions

Interchange X and Y (then transform as specified below).

Transform X values using $X=\text{Log}(X)$ K=

Transform Y values using $Y=k*Y$ K=

Same K for all data sets. K =

Different K for each data set

Data: K =

When it is impossible to transform a SD or SEM

- Erase SD or SEM.
- Convert to an asymmetric 95% confidence interval.

Replicates

- Transform individual Y values
- Transform the average of replicates

New graph

- Create a new graph of the results

Learn Cancel OK

Para fazer a regressão não linear:

GraphPad Prism 7.03 - [Project1:Transform of Normalize of Row stats of Data 1]

Analyze Data

Which analysis?

- Remove baseline and column math
- Transpose X and Y
- Fraction of total
- XY analyses
 - Nonlinear regression (curve fit)
 - Linear regression
 - Fit spline/LDWESS
 - Smooth, differentiate or integrate curve
 - Area under curve
 - Denning (Model I) linear regression
 - Column statistics
 - Row means with SD or SEM
 - Correlation
 - Interpolate a standard curve
- Column analyses
- Grouped analyses
- Contingency table analyses
- Survival analyses
- Parts of whole analyses
- Generate curve
- Simulate data
- Recently used

Analyze which data sets?

- A: Leitura MTT (D.O.)

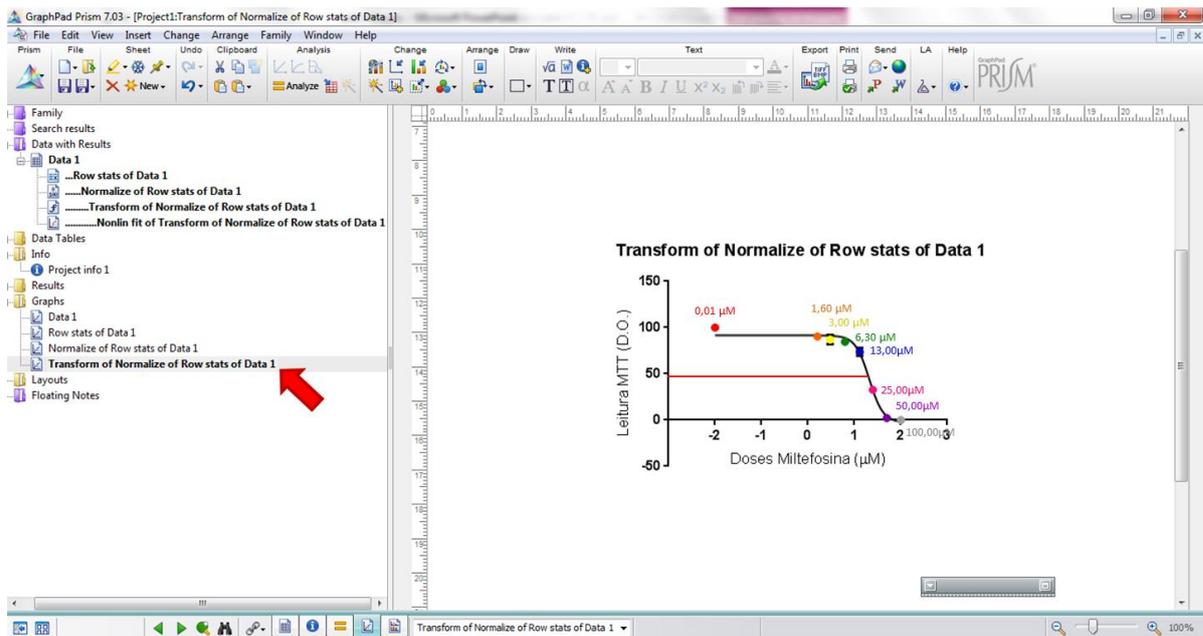
When you analyze tables or graphs with more than one data set, use this space to select which data set(s) to analyze.

Select All Deselect All

Help Cancel OK

Transform: X=Log(X)

Para ver o gráfico:



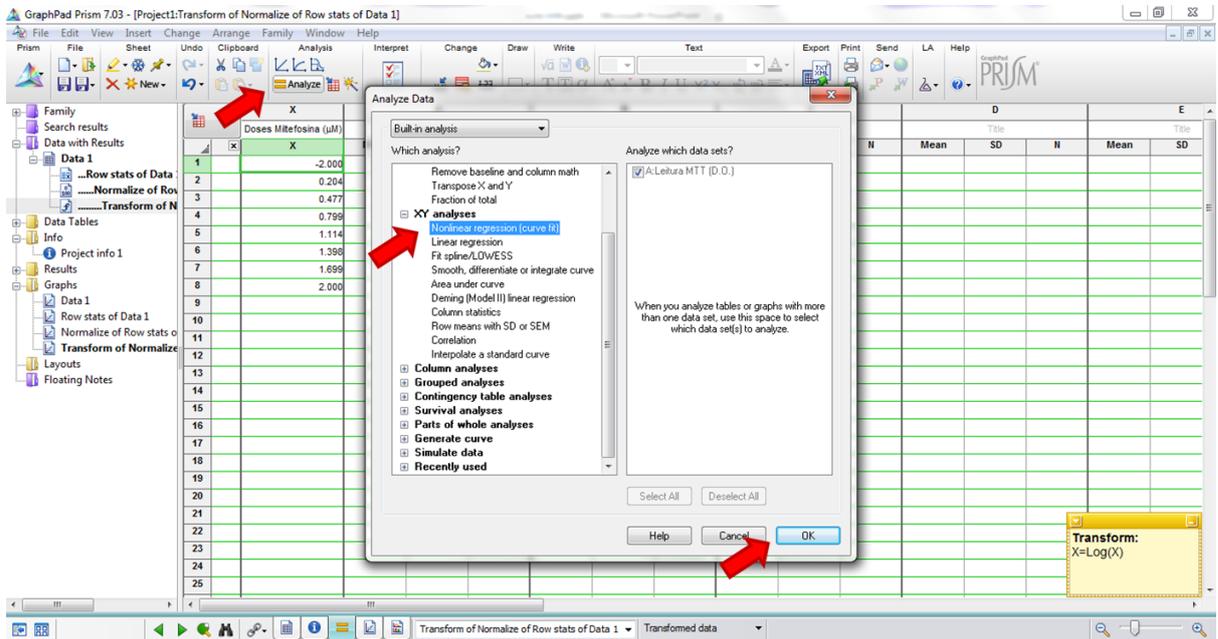
Olhem atentamente para o gráfico, percebam a distribuição dos pontos ao longo da curva, essa curva está boa?

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 programa?

P

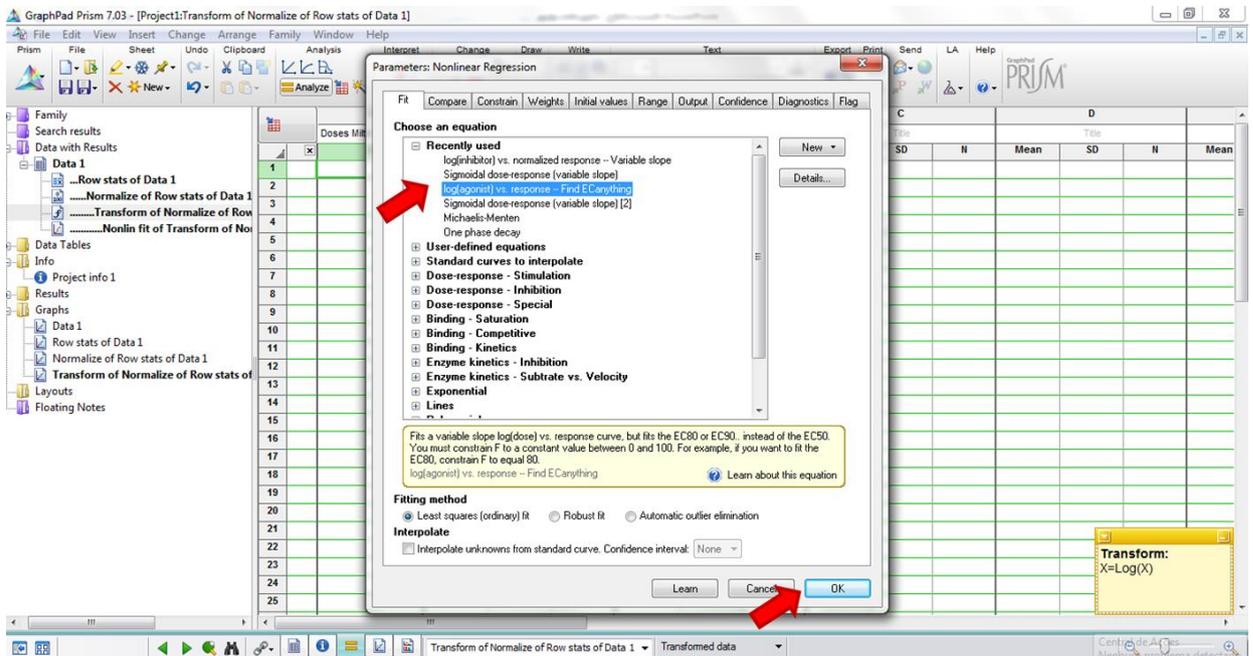
Para calcular a CE_{90} :

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



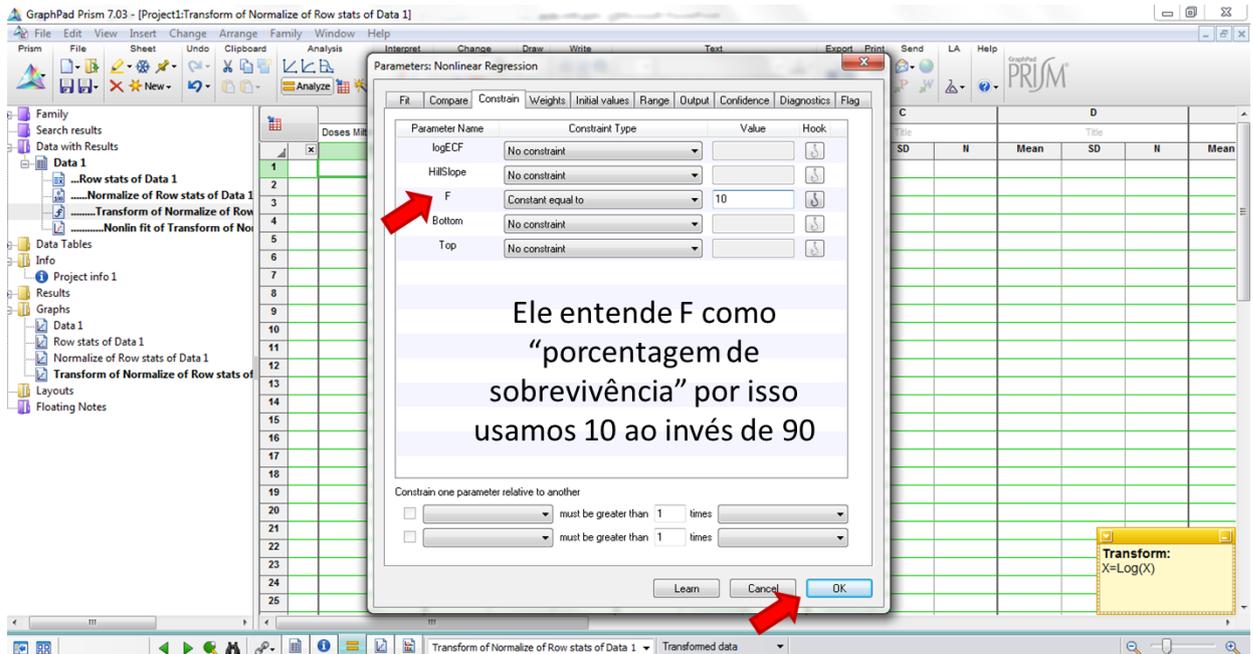
Em seguida:

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



Em seguida:

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.



- **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.

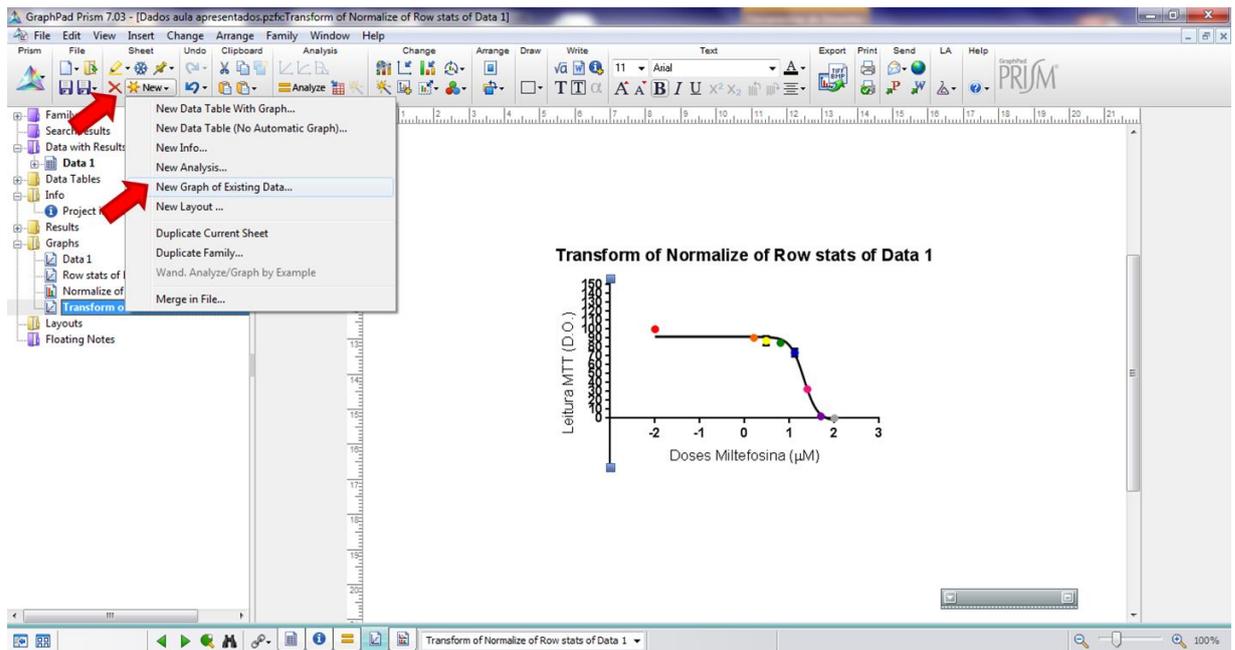
Para ver o resultado:

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.

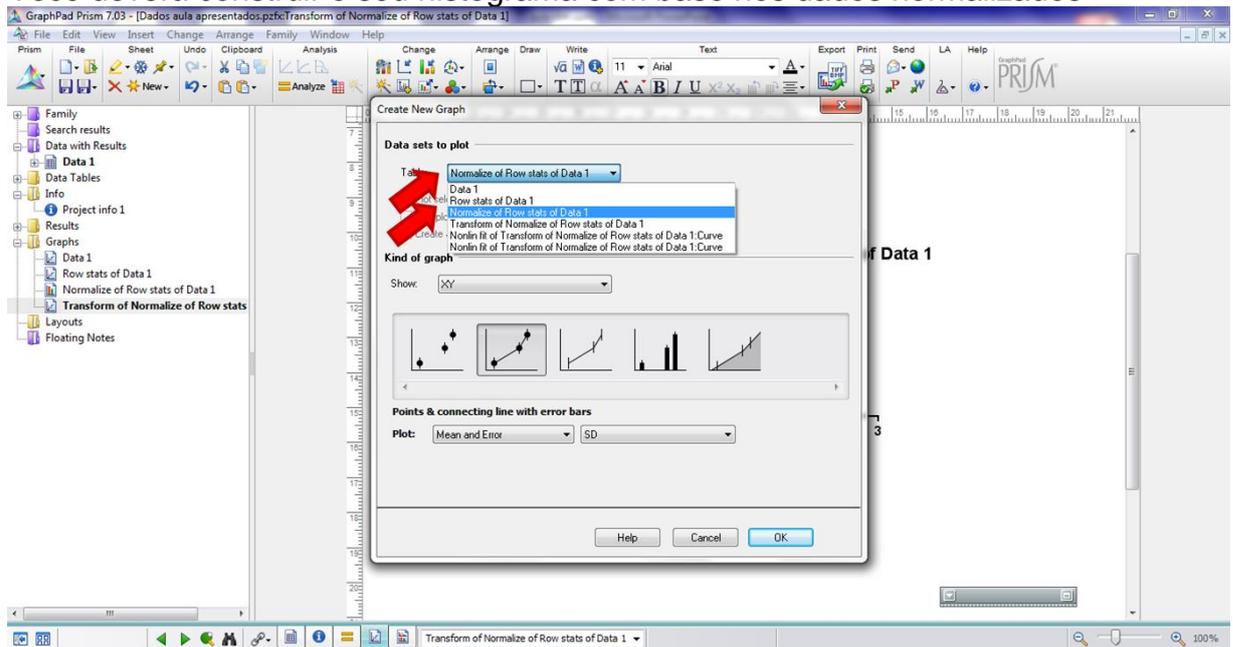
GraphPad Prism 7.03 - [Project1:Nonlin fit of Transform of Normalize of Row stats of Data 1]

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
	Leitura MTT (D.O.)	Title	Title	Title	Title	Title	Title	Title	Title
1	log(agonist) vs. response -- Find ECanything	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
2	Best-fit values								
3	logECF	1.648							
4	HillSlope	-2.9							
5	F	= 10							
6	Bottom	-2.652							
7	Top	91.58							
8	ECF	44.5							
10	Span	94.24							
10	Std. Error								
11	logECF	0.05036							
12	HillSlope	0.3648							
13	Bottom	2.912							
14	Top	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	Top	68.19 to 95.17							
21	ECF	35.95 to 60.53							
	Goodness of Fit								
23	Degrees of Freedom	20							
24	R square	0.9855							

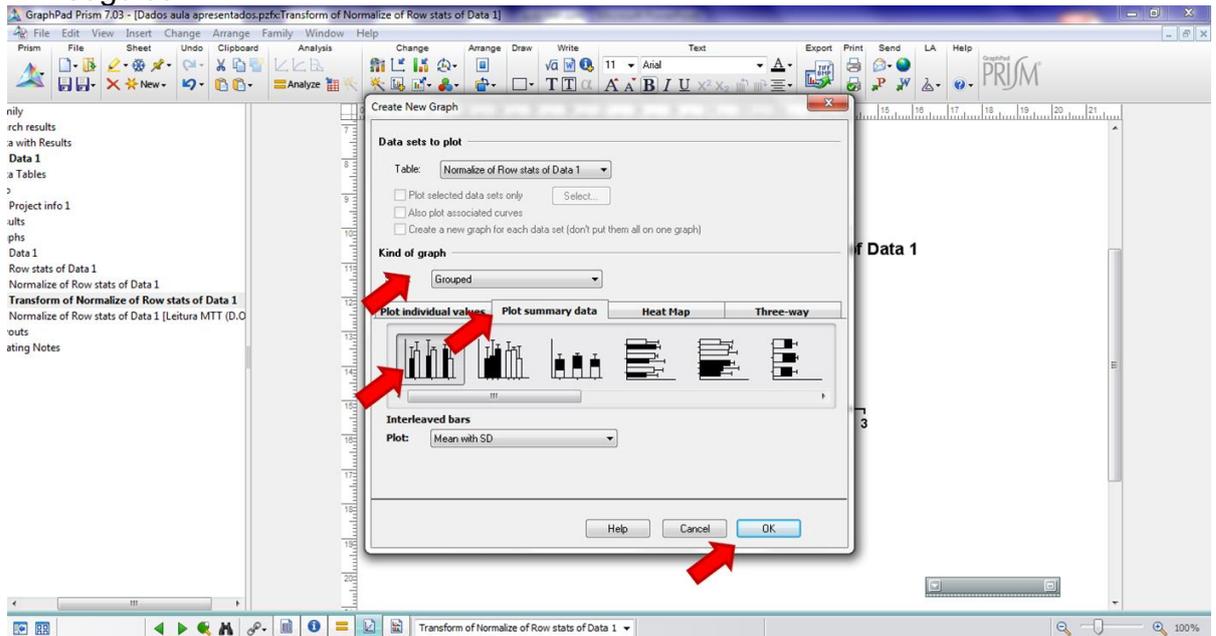
Para ver os dados obtidos em um formato diferente de gráfico, como o histograma:



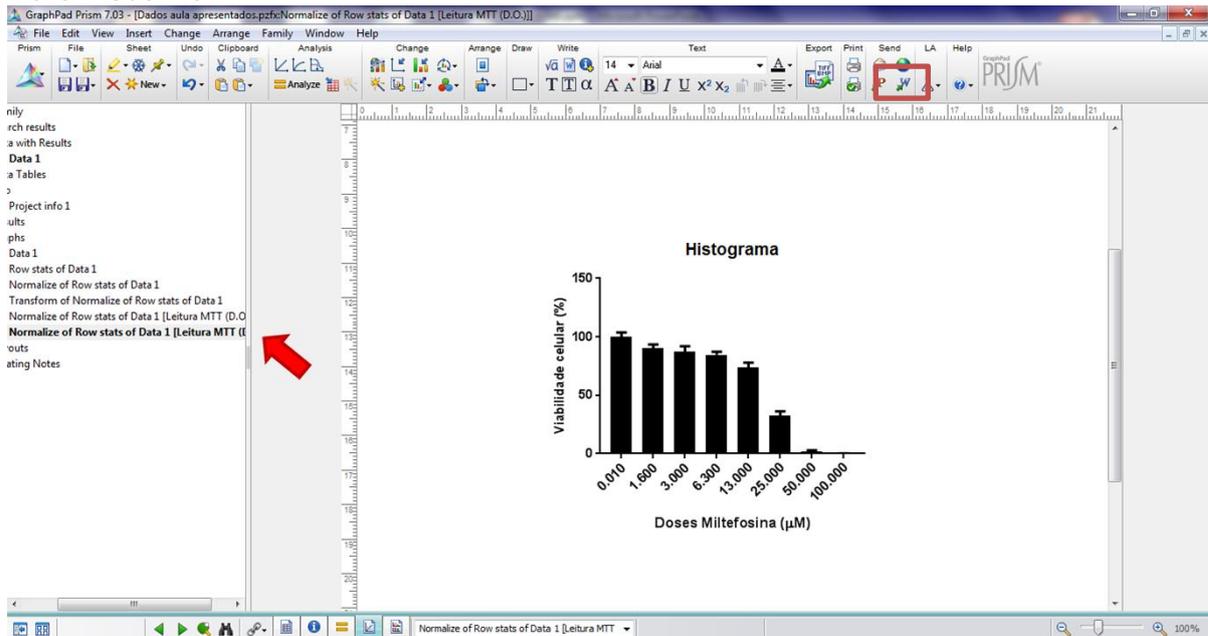
Em seguida:
Você deverá construir o seu histograma com base nos dados normalizados



Em seguida:



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

Grupo: _____

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

6. _____

7. _____

8. _____

Dados: () M2903 - Miltefosina () Isolado A - Miltefosina
() Isolado B - Miltefosina () Isolado C - Miltefosina
() M2903 - Anfotericina () Isolado A - Anfotericina
() Isolado B - Anfotericina () Isolado C - Anfotericina

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.

Cálculo de EC₅₀

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

Cálculo de EC₉₀

Com base nos valores fornecidos, construa a curva sigmoideal 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.