

AULA PRÁTICA 2- 24/05/2016

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

Os tripanossomatídeos em cultura foram isolados de mosca, provavelmente não infectam humanos e podem corresponder a nova(s) espécie(s).

Usando luva e avental- embora normalmente não patogênico, é importante tomar cuidado!- montem lâminas com 10 µl da cultura, cobrindo com lamínula. 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).

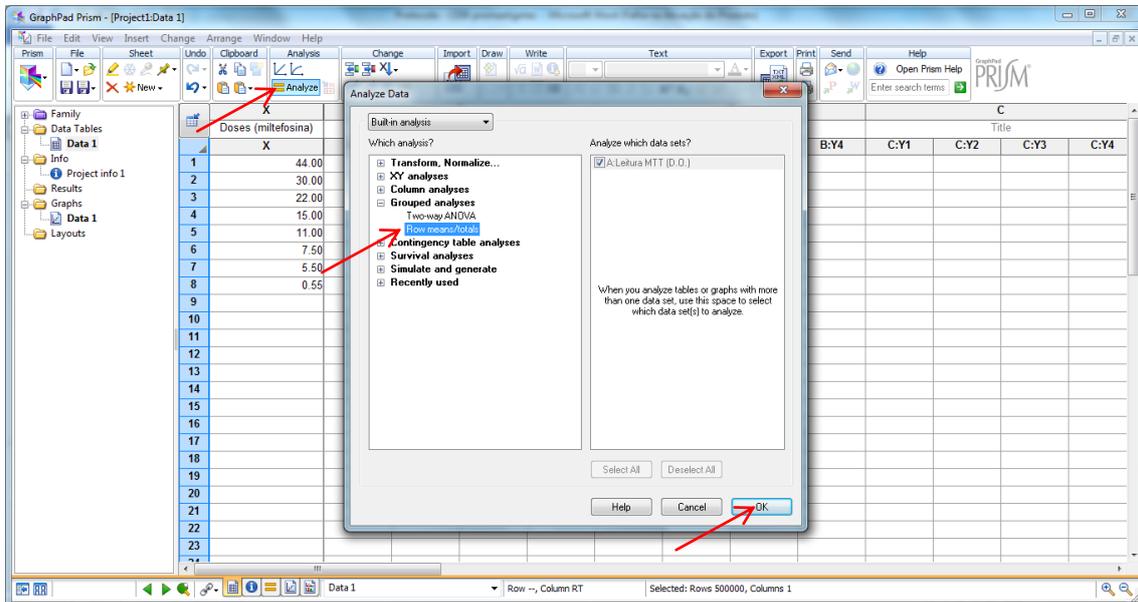
20 µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço da placa, que foi incubada por 4 h a 25 °C.

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

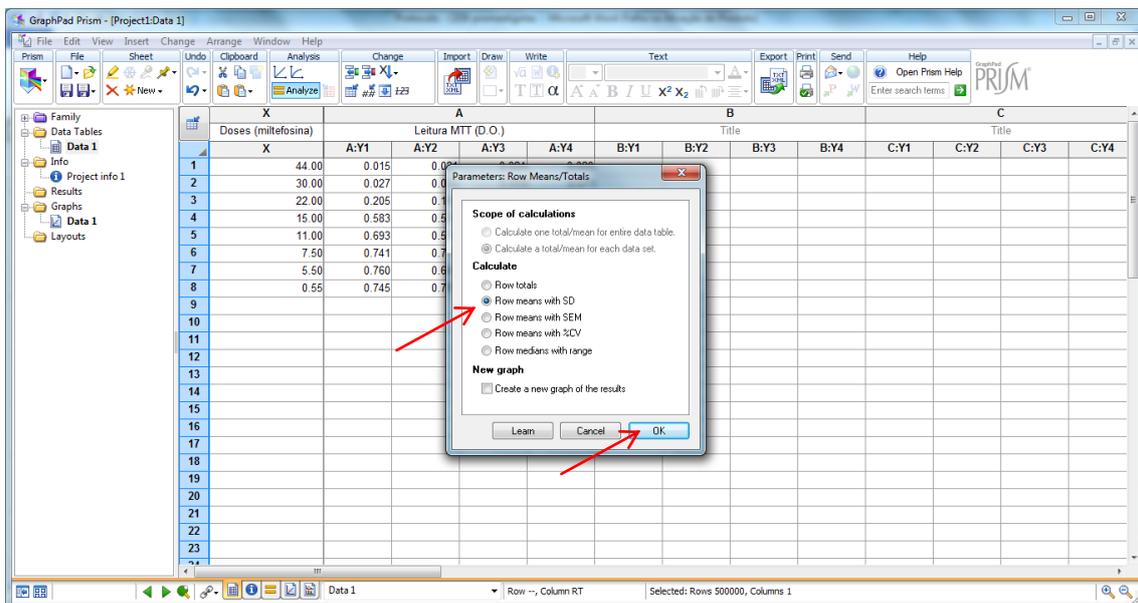
A densidade óptica (DO) foi determinada a 550 nm.

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

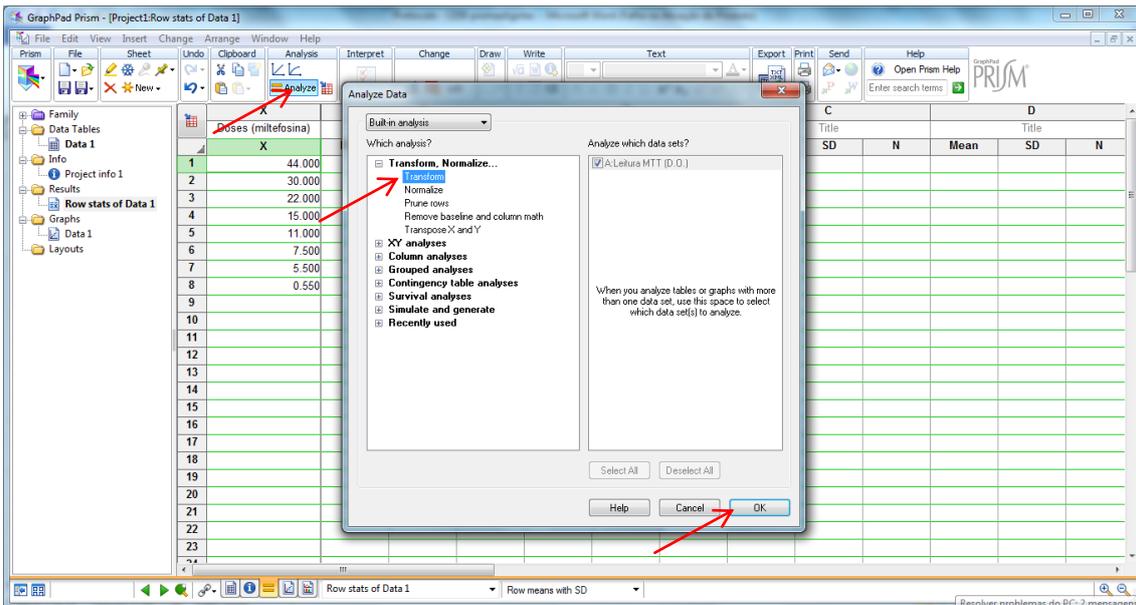
Para fazer a média das triplicatas:



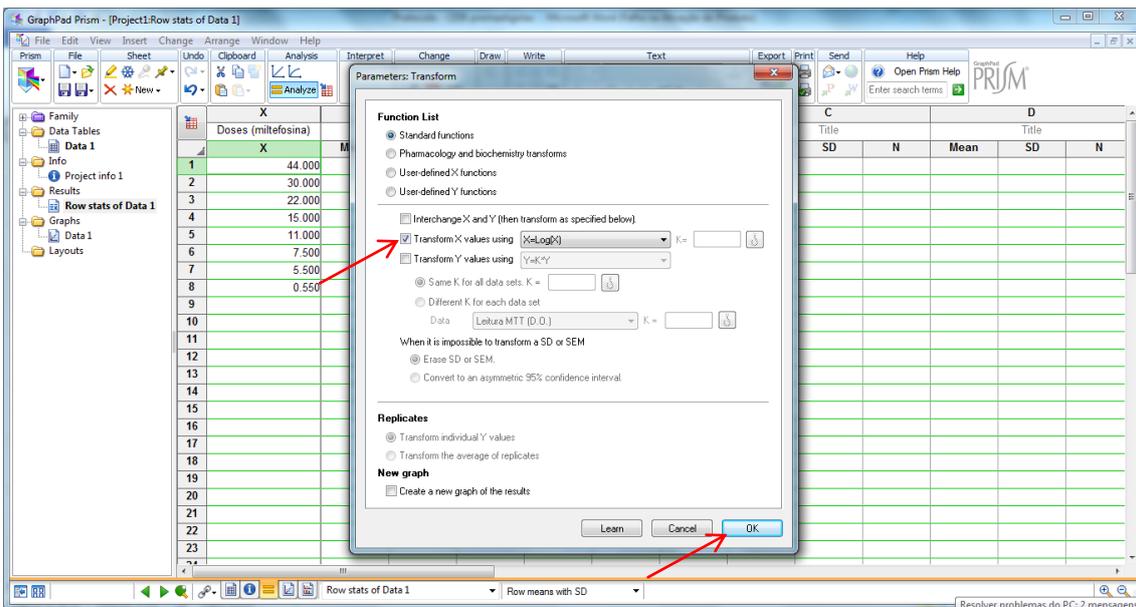
Em seguida:



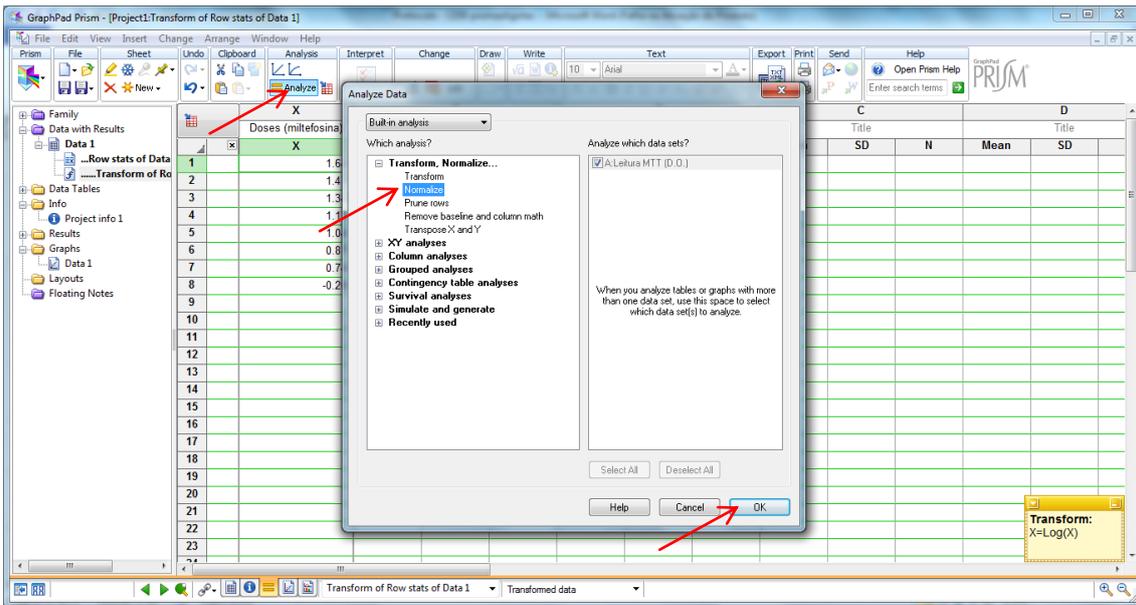
Para transformar os valores em log:



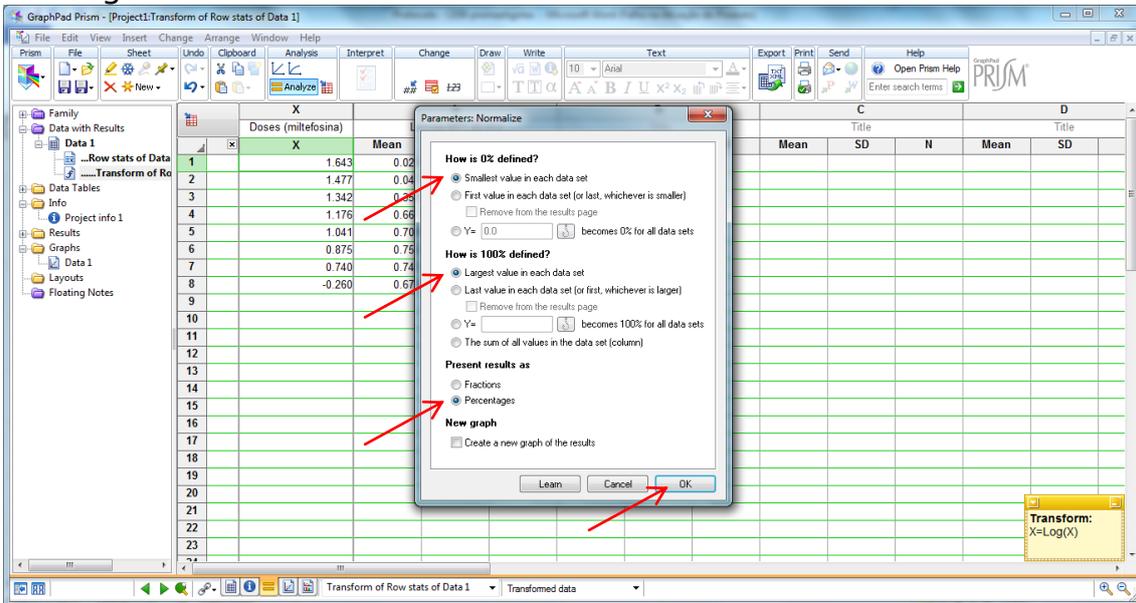
Em seguida:



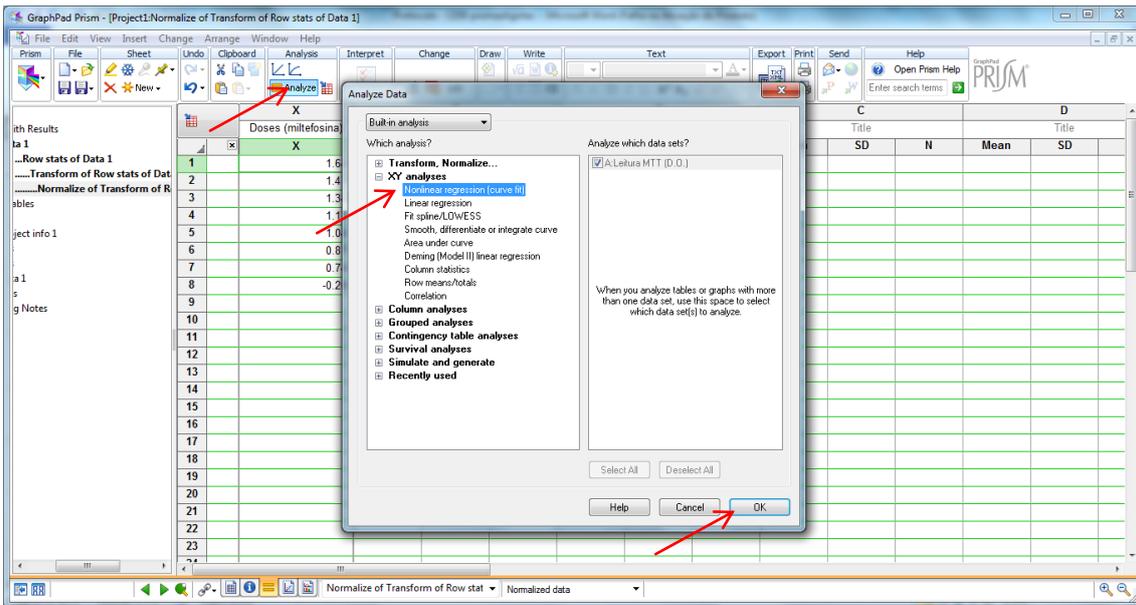
Para normalizar os valores de acordo com o controle não tratado:



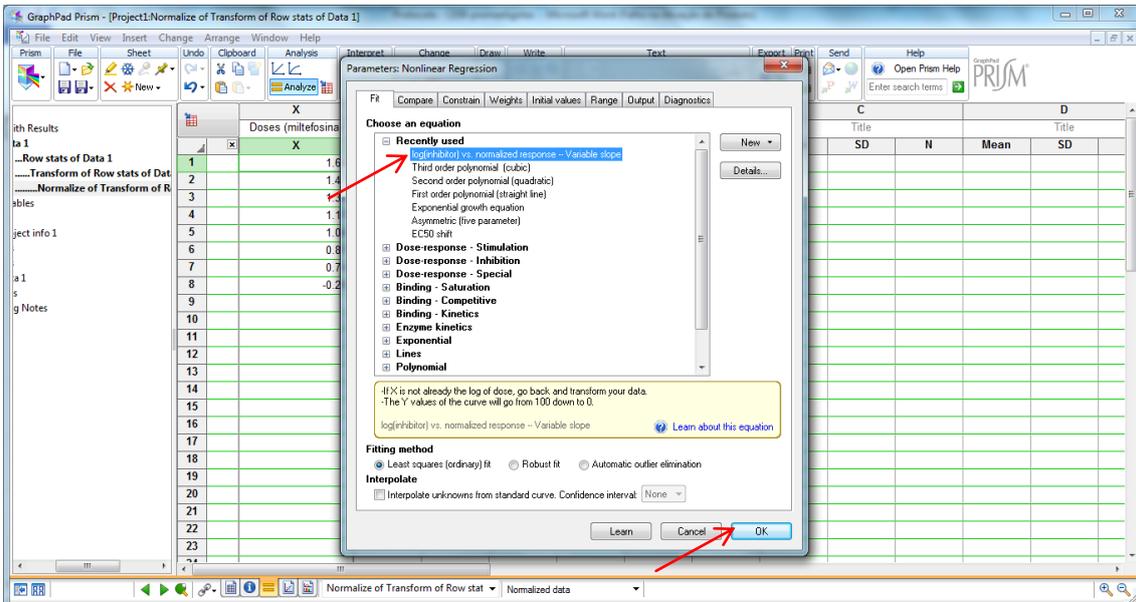
Em seguida:



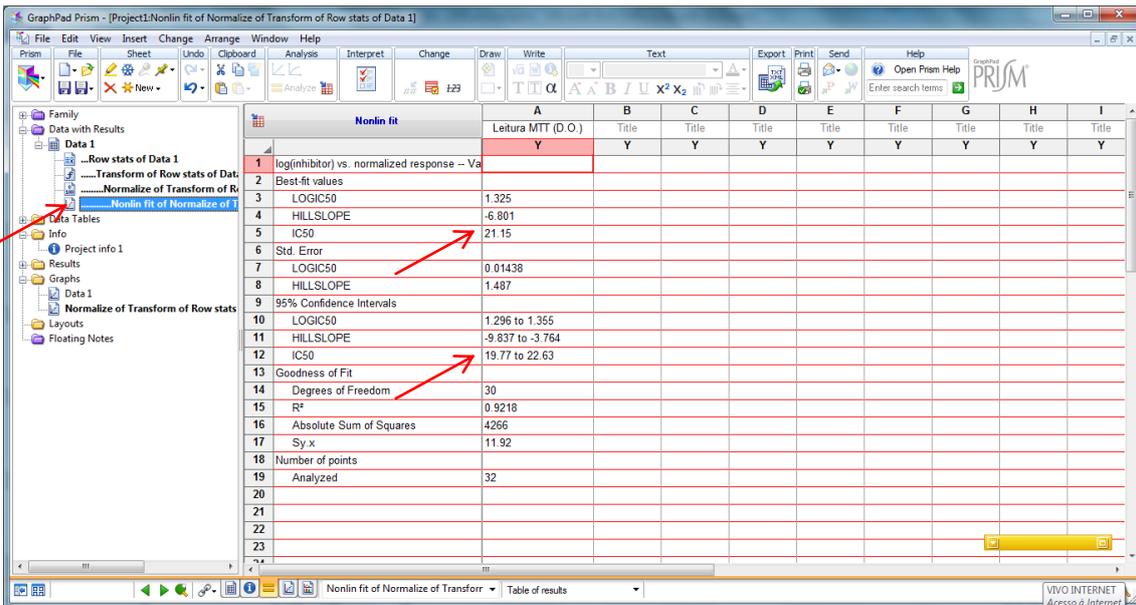
Para fazer a regressão não linear:



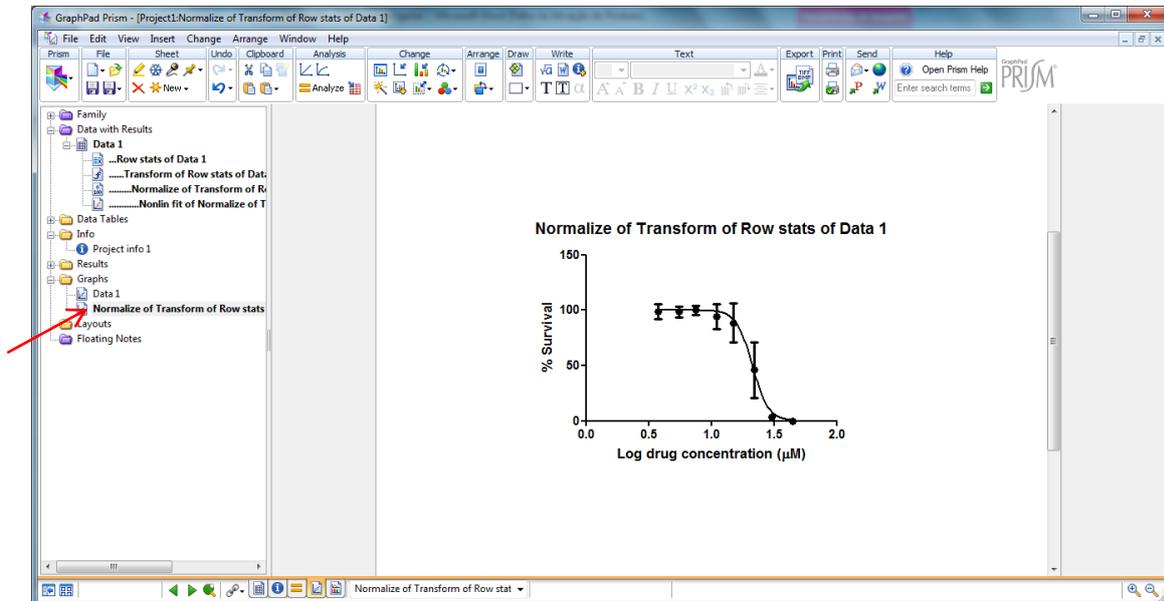
Em seguida:



Para ver o resultado de CE₅₀ e IC95%:



Para ver a curva de CE₅₀:



AULA PRÁTICA 2- 2016

Grupo:

| | |
|----|--|
| 1. | |
| 2. | |
| 3. | |
| 4. | |
| 5. | |
| 6. | |
| 7. | |

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 sigmoideal e calcule o valor de CE₅₀ para seu fármaco.

Observação de tripanossomatídeos não patogênicos ao homem

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