

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).

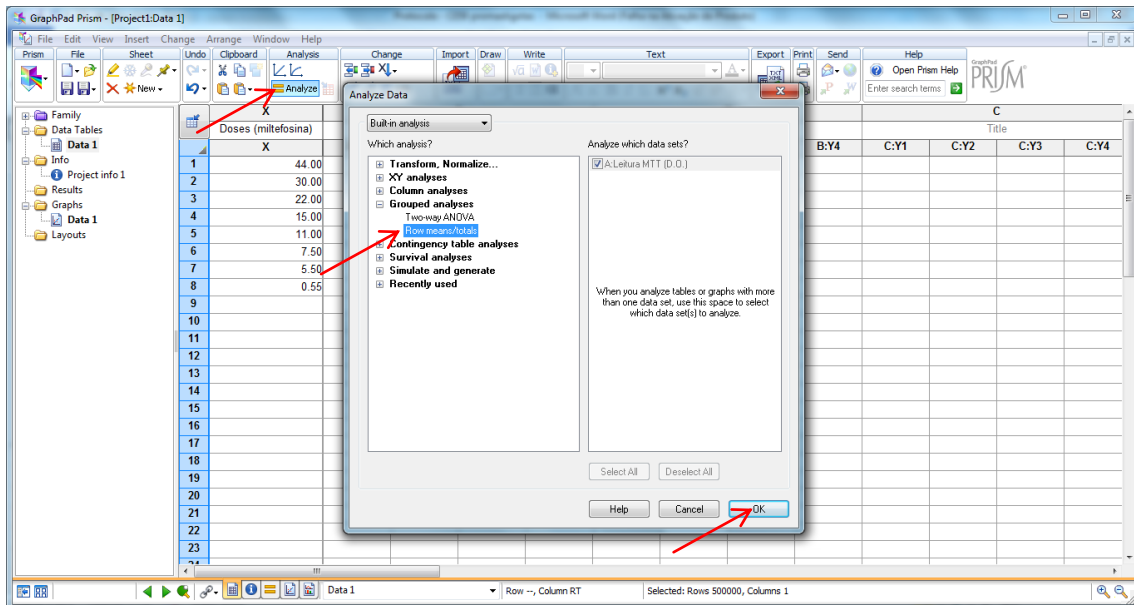
20 µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço da placa, que foi incubada por 4 h a 25 °C.

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

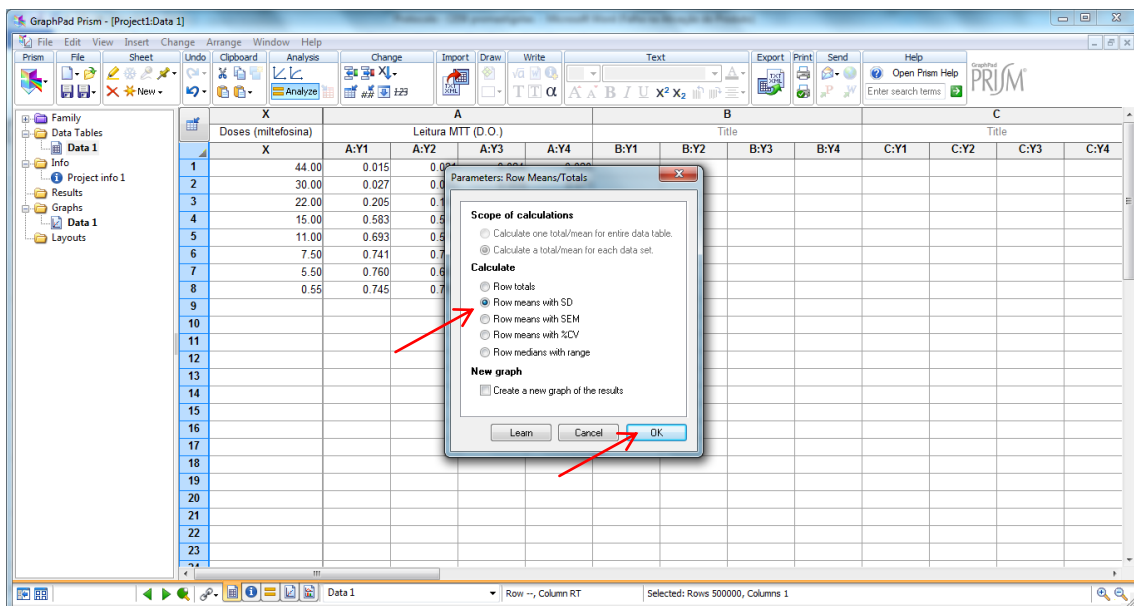
A densidade óptica (DO) foi determinada a 550 nm.

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

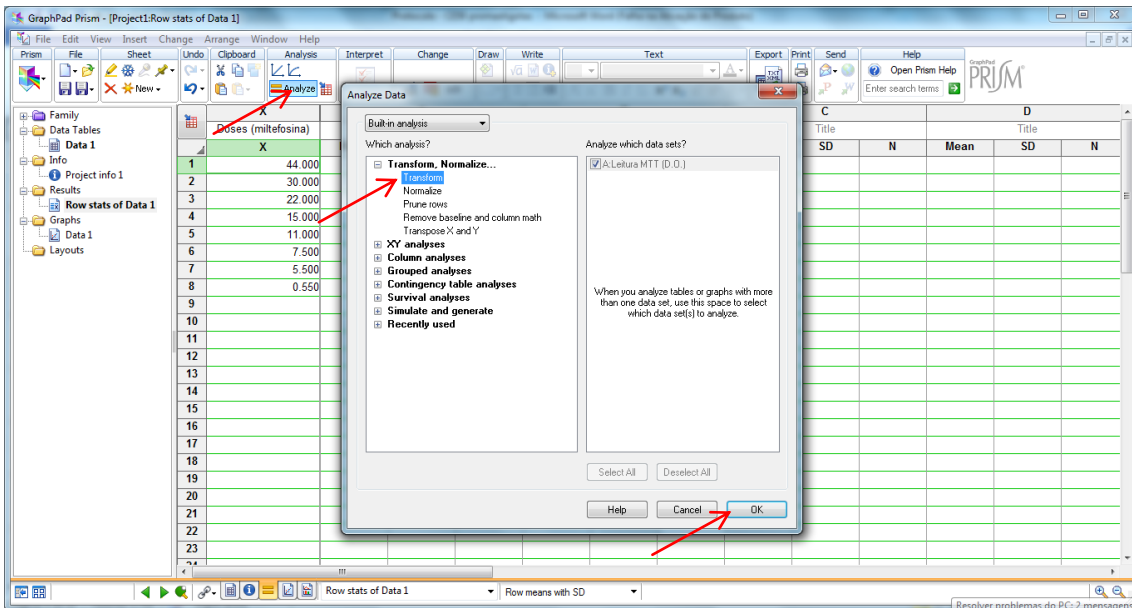
Para fazer a média das triplicatas:



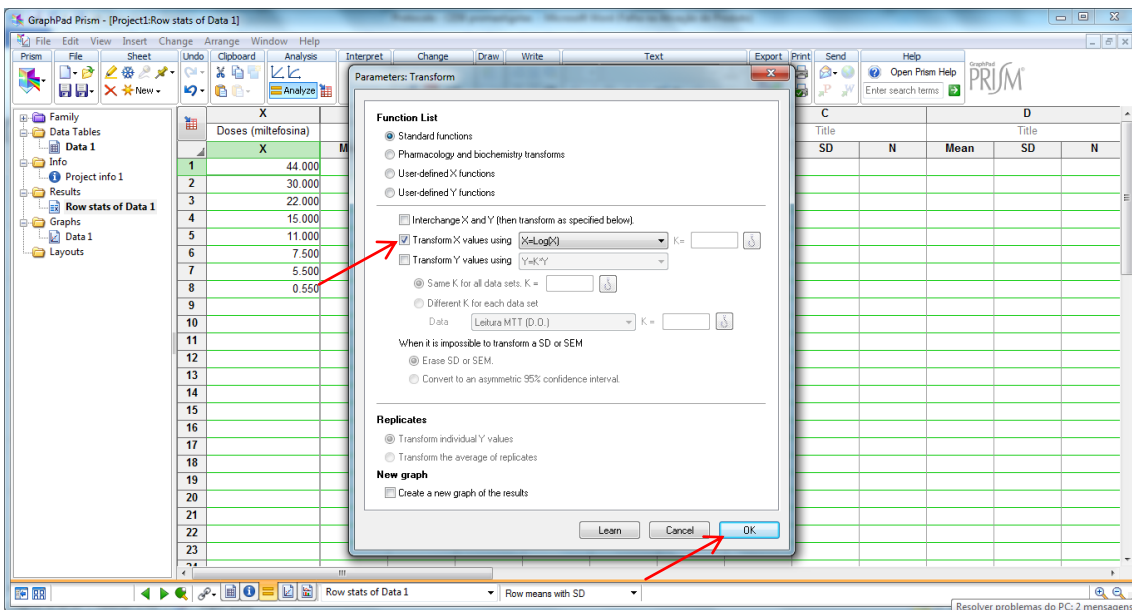
Em seguida:



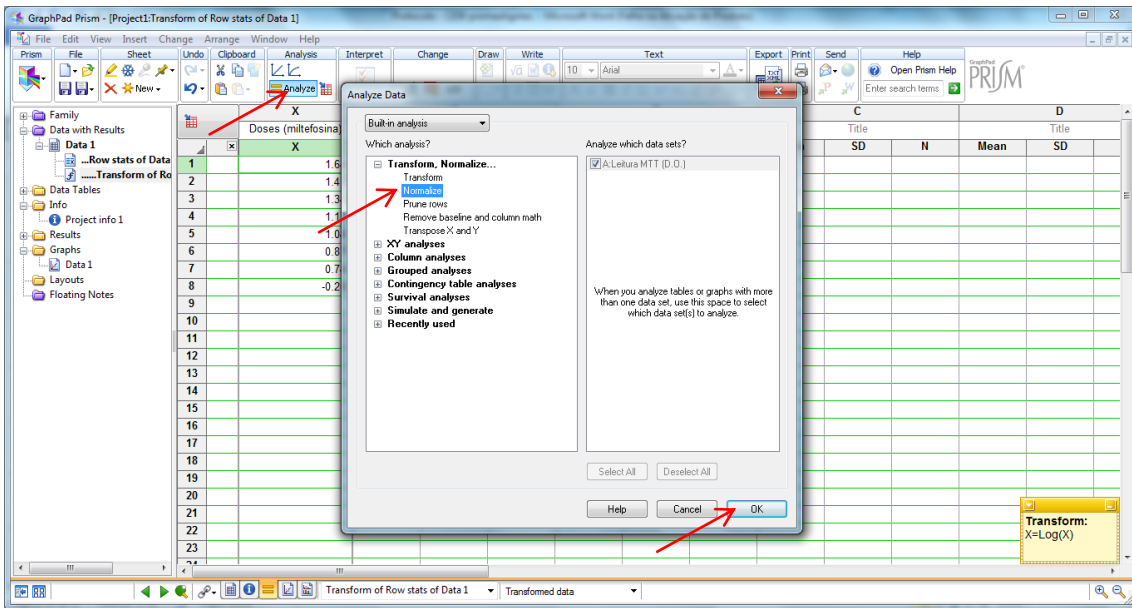
Para transformar os valores em log:



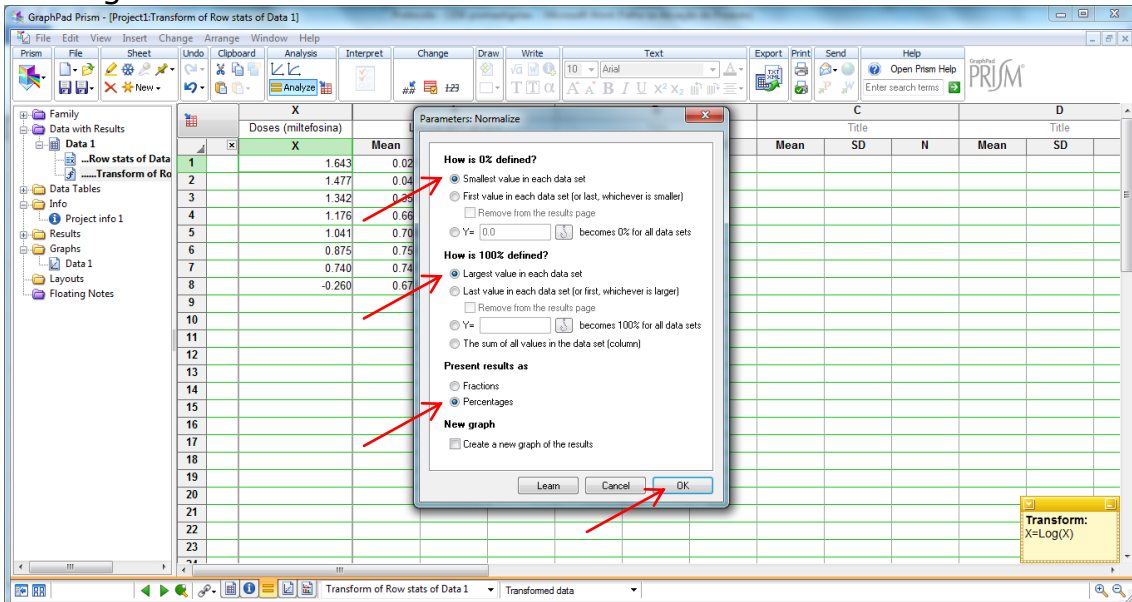
Em seguida:



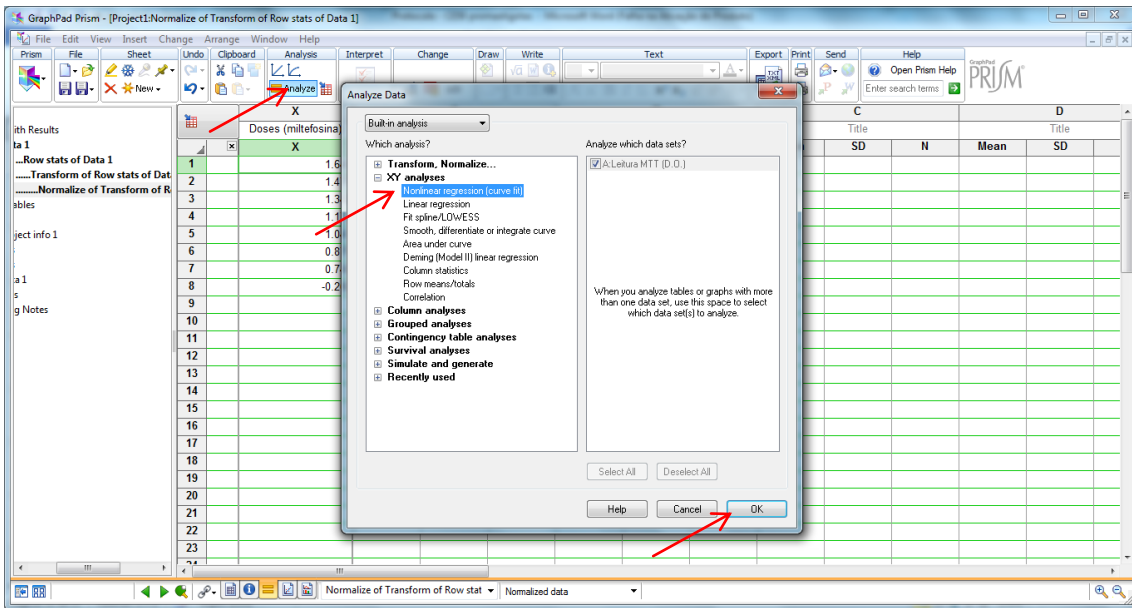
Para normalizar os valores de acordo com o controle não tratado:



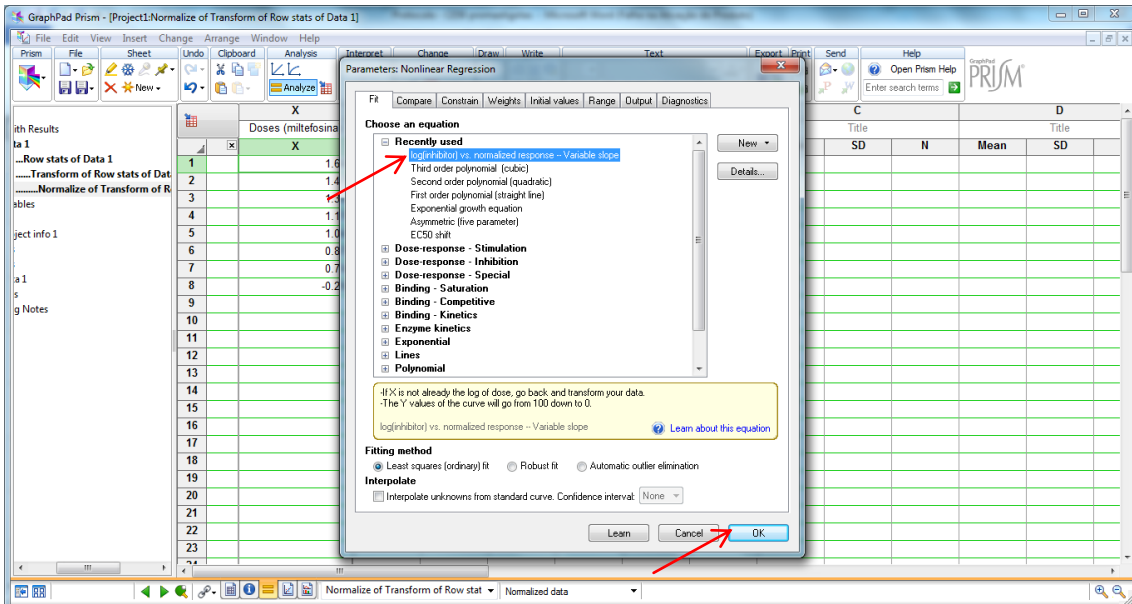
Em seguida:



Para fazer a regressão não linear:



Em seguida:



Para ver o resultado de CE₅₀ e IC95%:

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

File Edit View Insert Change Arrange Window Help

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

Family Data with Results Data 1 ...Row stats of Data 1 ...Transform of Row stats of Data 1 ...Normalize of Transform of Row stats of Data 1 ...Nonlin fit of Normalize of Transform of Row stats of Data 1

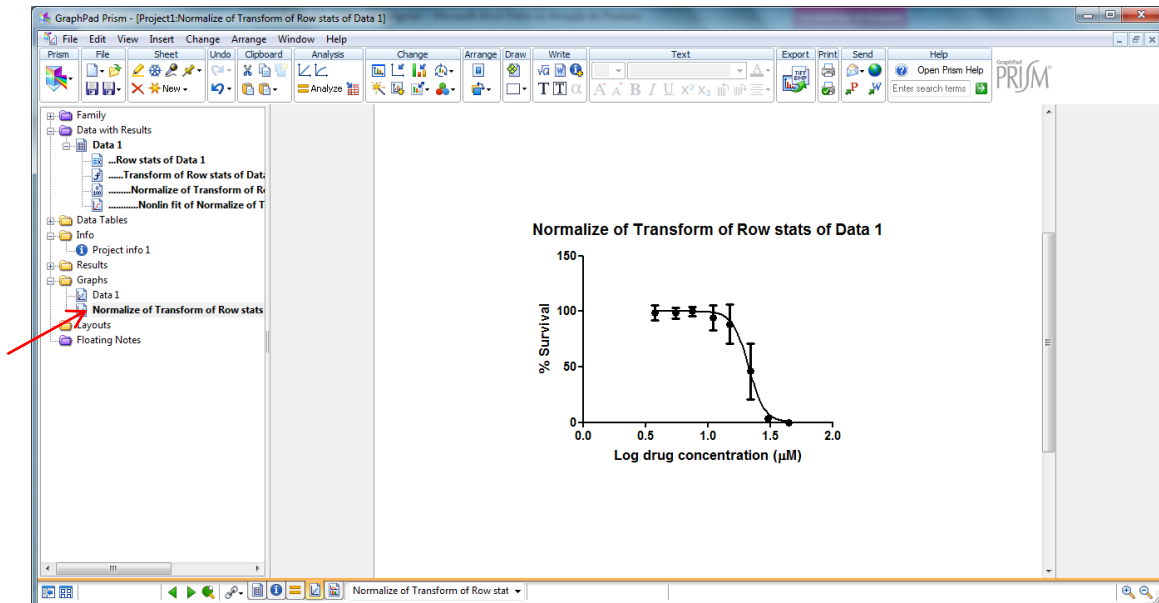
Data Tables Project info 1 Results Graphs Data 1 Normalize of Transform of Row stats Layouts Floating Notes

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
	Leitura MTT (D.O.)	Title	Title	Title	Title	Title	Title	Title	Title
1	log(inhíbitor) vs. normalized response - Va	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									

Nonlin fit of Normalize of Transform of Row stats of Data 1 Table of results

VIVO INTERNET
Acesso à Internet

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).