|  |
| --- |
| **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA****PROGRAMA DA DISCIPLINA DE PÓS-GRADUAÇÃO** |
| **DADOS DE IDENTIFICAÇÃO** |
| **Disciplina:** Citometria de Fluxo e Cultura de Células: Fundamentos e Aplicações  |
| **Nº. de Créditos**: 2 (T) | **Carga Horária**: 30 Horas | **Semestre/Ano**: 2/2020 |
| **Professora Responsável:** Micheli Mainardi Pillat (micheli.pillat@ufsm.br) |
| **EMENTA** |
| Aspectos básicos da citometria de fluxo. Calibração do aparelho, fluoróforos e compensação. Imunofenotipagem dos subtipos celulares. Avaliação da proliferação celular e ciclo celular. Morte celular. Análises de vias de sinalização intracelular. Análise de citocinas. Análises de câncer e infecções. Aspectos básicos do *cell sorting* e anticorpos naturalmente ligados as células. Análise de dados no software *Flowjo V10*. Aspectos básicos da infraestrutura e preparo das amostras para cultura. Cultura de linhagens celulares e de células primárias. Principais ensaios com células em cultura. |
| **OBJETIVOS**(ao término da disciplina o aluno deverá ser capaz de...) |
| * Compreender conceitos básicos de citometria de fluxo e cultura de células
* Aprenderas aplicações do método na investigação científica, especialmente na fenotipagem de células, níveis de expressão de receptores e proteínas específicas, marcação intracelular de vias de sinalização, avaliação de ativação celular, proliferação, apoptose, citotoxicidade de drogas;
* Ser capaz de analisar criticamente o uso dessas ferramentas em projetos de pesquisa.
 |
| **CONTEÚDO** |
| * UNIDADE 1: INTRODUÇÃO AO CURSO
	1. - Aspectos históricos.
	2. - Princípios básicos de citometria de fluxo.
	3. - Vantagens e desvantagens da citometria de fluxo.
	4. - Definições de antígeno, anticorpo e epítopo.
	5. - Anticorpos monoclonais e policlonais.
* UNIDADE 2: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DA FLUORESCÊNCIA
	1. - Fontes de luz e filtros ópticos.
	2. - Dinâmica de fluídos.
	3. - Detectores.
	4. - Escolha dos fluoróforos.
	5. - Métodos para conjugar um fluoróforo ao anticorpo.
* UNIDADE 3: ANÁLISE MULTIPARAMÉTRICA NO EQUIPAMENTO
	1. - Calibração do aparelho.
	2. - Compensação.
	3. - *Time*: um parâmetro indispensável para qualquer análise.
* UNIDADE 4: IMUNOFENOTIPAGEM
	1. - Preparo das amostras conforme os alvos a serem analisados.
	2. - Imunofenotipagem: da pesquisa básica ao diagnóstico de leucemias e linfomas
	3. - Análise da ativação celular: ativação plaquetária, de importância clínica.
	4. - Análise semi-quantitativa da expressão de receptores e proteínas específicas.
* UNIDADE 5: ANÁLISES QUANTITATIVAS E SEMIQUANTITATIVAS DE VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR E CITOCINAS
	1. Análises das vias de sinalização intracelular das MAP quinases
	2. Avaliação dos níveis de cálcio citoplasmáticos
	3. Análises de intermediários reativas de oxigênio e potencial mitocondrial.
	4. Imunoesnsaios baseados em *beads*: para identificação de antígenos solúveis como citocinas e hormônios.
	5. Análise da frequência de células expressando citocinas por detecção citoplasmática.
* UNIDADE 6: CITOMETRIA DE FLUXO EM ESTUDOS DA PROLIFERAÇÃO, CICLO CELULA, MORTE CELULAR E CARIÓTIPO.
	1. Avaliação da proliferação celular por análogos da timidina BrdU ou EdU
	2. Avaliação do número de divisões celulares ao longo de um período de tempo CFSE.
	3. Análises da distribuição e duração das fases do ciclo celular.
	4. Análise da fragmentação do DNA, morte celular geral ou por apoptose inicial e tardia ou necrose.
	5. Análise do cariótipo por cromomicina A3 e Hoechst 33258.
* UNIDADE 7: Anticorpos naturalmente ligados a células e *CELL SORTING*.
	1. Testes de Crossmatch: linfócitos do doador e soro do receptor potencial do transplante;
	2. Análise de anticorpos anti-plaquetas: púrpura trombocitopênica autoimune
	3. Aspectos do *Cell Sorting* (isolamento em tudo distinto de diferentes populações celulares).
* UNIDADE 8: CITOMETRIA DE FLUXO NO ESTUDO DO câncer E DE INFECÇÕES
	1. Aspectos da citometria de fluxo nas pesquisas básicas, clínica e no diagnóstico de câncer.
	2. Aspectos das Nanovesículas no câncer e em outras patologias.
	3. Identificação de parasitas e outros microorganismos como bactérias e vírus
	4. Análise da invasão intracelular dos microrganismos
* UNIDADE 9: ANÁLISE DOS DADOS DE CITOMETRIA
	1. Análises multiparamétricas
	2. Analise das freqüências e intensidade de fluorescência média (MFI)
	3. Compensação no flowjo
	4. Construção do Layout

UNIDADE 10: NOÇÕES BÁSICAS DE INFRAESTRUTURA E PREPARO DOS MATERIAIS PARA A CULTURA DE CÉLULAS* 1. Infraestrutura e equipamentos de uma sala de cultura.
	2. Esterilização e preparo dos materiais.

UNIDADE 11: CULTURA DE LINHAGENS CELULARES E CULTURAS PRIMÁRIAS * 1. Procedimento básico no fluxo laminar.
	2. Técnica ideal de descongelamento, congelamento e repicagem da cultura.
	3. Ensaios de citotoxicidade, migração, quimioatração e formação de colônias com linhagens celulares.
	4. Extração de leucócitos do sangue periférico e ensaio de proliferação.
 |
| **AULAS PRÁTICAS** |
| * Imunofenotipagem
* Ciclo Celular
* Fragmentação do DNA
* Cultura de linhagens celulares
* Isolamento e cultura de leucócitos do sangue periférico
* Ensaio de proliferação celular.
* Análise dos dados no software flowjo V10
 |
| **METODOLOGIA E RECURSOS UTILIZADOS** |
| * Aulas expositivas dialogadas, com a utilização do quadro e datashow;
* Aulas práticas em laboratório de cultura e utilização do equipamento Citômetro de Fluxo;
* Análise de dados de citometria de fluxo com o software Flowjo V10;
* Resolução de exercícios;
* Problematização;
* Estudo de casos;
* Seminários;
* Trabalho de pesquisa individual;
* Apresentação de trabalho.
 |
| **AVALIAÇÃO** |
| Para fins de avaliação, será considerada a participação em aula, indicadores de comprometimento (leitura dos textos, assiduidade e pontualidade), entrega de exercícios e apresentação de seminário. A avaliação também será feita mediante apresentação de um projeto de pesquisa elaborado considerando o uso das técnicas abordadas na disciplina ou cultura de células. Cada aluno realizará uma apresentação de 10 minutos seguida de 5 minutos para perguntas. |
| **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** |
| Referências Básicas:SHAPIRO, Howard M. *Practical Flow Cytometry*. John Wiley & Sons,3ª ed., 2005. ABBAS*et al*. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 8ª ed., 2015.JANEWAY. C.; TRAVERS, P. *Imunobiologia: o Sistema Imune na Saúde e na Doença*.Ed. Artes Médicas Sul, 8ª ed., 2014. |

.