|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **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. | | |

.