

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Bioquímica das peptidases: dosagem proteolítica em tripanossomatídeos

CARGA HORÁRIA: APROXIMADAMENTE 360 HORAS – de segunda a sexta-feira, período parcial (das 8 às 12 horas ou das 13 às 17 horas)

COORDENADORES: Vítor Ennes Vidal

EMENTA

Este curso destina-se a alunos interessados em aprofundar seus conhecimentos em estudos bioquímicos, com foco nas enzimas proteolíticas conhecidas como peptidases. O programa aborda os fundamentos teóricos e práticos relacionados à análise de peptidases em protozoários parasitas da família Trypanisomatidae, os tripanossomatídeos. A especialização tem ênfase na identificação das classes proteolíticas e na dosagem de sua atividade em variados substratos. O aluno será apresentado às noções básicas de preparo de meios de cultura para o cultivo de tripanossomatídeos, além de técnicas de extração e dosagem de proteínas, como a zimografia e dosagem da atividade em solução por espectrofluorimetria. Ao término do curso, espera-se que o aluno adquira habilidades para compreender os princípios bioquímicos e aplicar técnicas de dosagens de atividade enzimática, assim como estar apto a discutir e interpretar os resultados obtidos.

OBJETIVO

- 1- Capacitar o aluno a manusear os equipamentos básicos utilizados em laboratório de protozoologia;
- 2- Apresentar a fundamentação teórica e conhecimento técnico básico de cultivo de parasito, como: condições biológicas e bioquímicas para sua manutenção, proliferação e criopreservação.
- 3- Ensinar metodologias de extração de proteínas dos tripanossomatídeos cultivados;
- 4- Apresentar as técnicas de dosagem de proteínas, assim como dosagem enzimática pela zimografia e espectrofluorimetria;

- 5- Orientar sobre o uso de inibidores proteolíticos para identificação de classes proteolíticas;
- 6- Capacitar a interpretação dos dados gerados pela dosagem de proteínas e pela mensuração da atividade proteolítica.

CONTEÚDO PROGRAMÁTICO

Formação teórica a ser oferecida ao aluno:

Princípios básicos de cultivo celular, meio de cultura e soluções utilizadas em cultivos de protozoários;

Noções de biossegurança aplicada a laboratórios de cultivo celular e de processo de esterilização (por autoclave e por filtração em membranas);

Princípios básicos de Transmitância e Absorbância (Lei de Lambert-Beer) e aplicações na quantificação de macromoléculas;

Princípios básicos de peptidases, classificação, estruturas, sítio ativos, nomenclatura e funções biológicas;

Fundamentos básicos sobre eletroforese, espectrofotometria e espectrofluorimetria, vantagens e desvantagens de cada técnica;

Manuseio dos acessórios e da cuba de eletroforese vertical utilizados para os ensaios de zimografia; assim como orientação sobre o uso do espectrofotômetro e espectrofluorímetro;

Interpretação dos resultados observados pelos halos de degradação em gel zimografia e analisar das curvas cinéticas da dosagem em solução;

Fundamentação e orientação sobre o uso de inibidores proteolíticos e seus efeitos na dosagem da atividade das peptidases;

Considerações éticas na pesquisa.

Atividades práticas a serem desenvolvidas pelo aluno durante o estágio:

- 1.1 Cálculos para preparo de soluções (concentração, proporção, diluições simples e seriadas, fator de diluição);
- 1.2 Preparo de soluções e meios de cultura;
- 1.3 Funcionamento do pHmetro e Espectrofotômetro;
- 1.4 Quantificação direta do parasito em câmara de Neubauer;
- 1.5 Manutenção de cultivo de tripanossomatídeos;
- 1.6 Extração de proteínas;
- 1.7 Dosagem de proteínas por espectrofotometria;
- 1.8 Eletroforese de proteínas para análise por zimografia;
- 1.9 Dosagem em solução da atividade proteolítica com diversos substratos;
- 2.0 Efeito do pH e dos inibidores proteolíticos na atividade enzimática;

Avaliação:

- 1- Um relatório parcial a ser enviado à coordenação do CENT na metade do curso (área de concentração). Esse relatório deverá ser avaliado e assinado pelo(a) aluno(a) e coordenador(a) da área.
- 2- Um relatório final a ser enviado à coordenação do CENT ao final do curso (área de concentração). Esse relatório deverá ser avaliado e assinado pelo(a) aluno(a) e coordenador(a) da área.
- 3- Participação em um workshop (elaboração e apresentação de pôster) ao final do curso (área de concentração). Os pôsteres serão avaliados por profissionais da área afim.
- 4- Participação ativa em atividades teórico-práticas relacionadas às áreas de concentração (seminários, estudos dirigidos, dentre outras), a critério do coordenador da área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. David L. Nelson & Michael M. Cox. Princípios de Bioquímica de Lehninger - 6ª Ed. 2014. Editora Artmed.
2. Geraldo Attilio de Carli. Livro de Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitologias humanas. 2º ed. Editora Ateneu.
3. Kathy Barker, Na Bancada. Manual de iniciação científica em laboratório de pesquisa biomédicas. Editora Artmed
4. André Santos, Marta Branquinha, Claudia d'Avila-Levy, Lucimar Kneipp & Cátia Sodré. Proteins and Proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma*. Editora Springer.