

TRABAJOS PRÁCTICOS DIRIGIDOS

Profesorado:

Dr. Diego Romero García

Dra. Emma Martínez López

Dr. Antonio Juan García Fernández

Ldo. Alejandro Hernández García

**(Grupo de Investigación E008-12 Toxicología,
Universidad de Murcia, España)**

Sesión 4. Cultivos en suspensión (II). Ensayo de citotoxicidad por espectrofotometría con eritrocitos

El objetivo de esta práctica es la evaluación de la citotoxicidad basal en eritrocitos tras la exposición a un agente químico, así como su estudio microscópico. Para ello se utilizará el material preparado en la sesión anterior.

Material adicional: videos.

Antes de proceder a la evaluación de la citotoxicidad se recogerá de cada microtubo una alícuota (10 µl) y se introducirá en un pocillo (placa de 24 pocillos) con 0.5 ml de medio de PBS para realizar el estudio morfológico (microscopía óptica), utilizando los siguientes aumentos: 10x, 20x y 40x.

Estudio de citotoxicidad basal por espectrofotometría. En este estudio el parámetro a evaluar será la hemólisis y medición de niveles de oxihemoglobina por espectrofotometría. Para ello los microtubos preparados en la sesión 3 serán centrifugados (microcentrífuga, 10.000 rpm, 1 minuto). El sobrenadante será trasvasado con mucho cuidado a una probeta de espectrofotometría. Para esta lectura se seguirá la siguiente pauta (modo fotométrico, 542 nm):

- Medir absorbancia del agua destilada.
- Hacer autocero.
- Medir absorbancia del sobrenadante del control negativo.
- Hacer autocero.
- Medir absorbancia de los sobrenadantes de los cultivos expuestos a plomo, empezando por la muestra expuesta a la concentración más baja y terminando por la más alta.
- Medir absorbancia del control positivo.

NOTA: la absorbancia del control negativo frente al agua ha de ser como mucho de 0.100. Si sobrepasa este valor desecharemos la muestra por haber hemólisis espontánea.

La absorbancia colorimétrica es directamente proporcional a la cantidad de células viables. El porcentaje de supervivencia es el siguiente:

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{X \text{ abs colorimet} - X \text{ abs blanco}}{X \text{ abs colorimet control}^* - X \text{ abs blanco}} \times 100$$

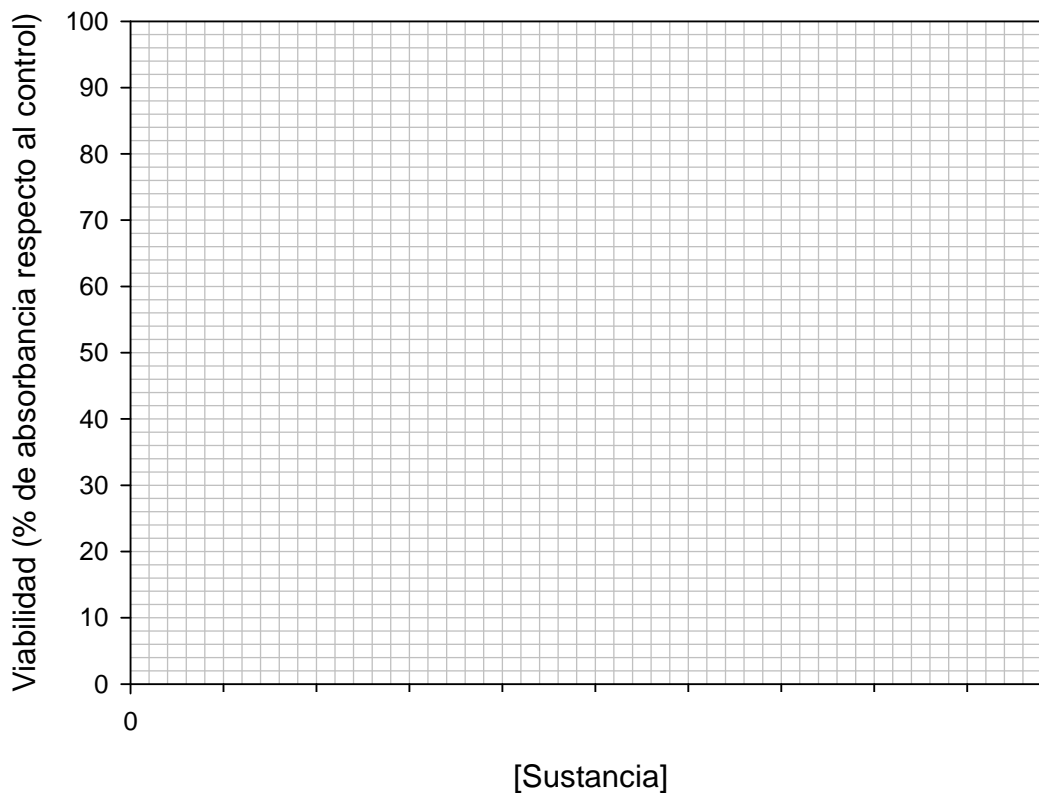
*Control positivo

El cálculo de las dosis efectivas se realizará mediante el estudio estadístico, utilizando para ello los programas informáticos correspondientes. Igualmente se procederá a la representación gráfica de las curvas dosis-respuesta utilizando el ajuste matemático correspondiente.

Curva dosis-respuesta

Responda a los siguientes ítems:

Cultivo.....Sustancia..... Técnica
Concentraciones ensayadas.....



Comente las características de la curva dosis-respuesta valorando la técnica utilizada, agentes evaluados, tiempo de exposición y cuantos parámetros considere necesarios. Indique la ecuación matemática a la que se han ajustado los resultados.

Estudio microscópico

Dibuje y describa el estado de cada cultivo:

