

TRABAJOS PRÁCTICOS DIRIGIDOS

Parte de este documento está tomado de Romero *et al.* “Métodos alternativos a la experimentación animal (Guía de prácticas)”. Ed. Diego Marín, Murcia (2005). ISBN: 84-8425-409-7

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 6. Cultivos en monocapa (II). Preparación de cultivo e inicio de ensayo de citotoxicidad basal

El objetivo de esta práctica es la preparación de un cultivo de células de crecimiento en monocapa para la evaluación de la citotoxicidad por colorimetría.

Material adicional: videos.

Evaluación de la citotoxicidad basal por colorimetría

La respuesta celular tras la exposición a las diferentes sustancias objeto de estudio (en términos de viabilidad celular) será evaluada usando las técnicas colorimétricas del Rojo Neutro y/o del MTT-tetrazolio, para cultivos con crecimiento en monocapa.

El procedimiento a seguir para la realización de los ensayos será el siguiente:

- Las células serán obtenidas a partir de cultivos próximos a la confluencia, las cuales serán tripsinizadas, centrifugadas, resuspendidas y contabilizadas.
- Una vez conocida la cantidad de células de que disponemos, procederemos a la siembra, en placas de microtitulación, de 5.000 células por pocillo en 180 µl de medio con SFB al 10%, dejando los bordes de la placa sólo con agua estéril.
- Las placas serán mantenidas en incubación (+37°C, 90% de humedad y 5% de CO₂) durante aproximadamente 48 horas (fase de latencia).

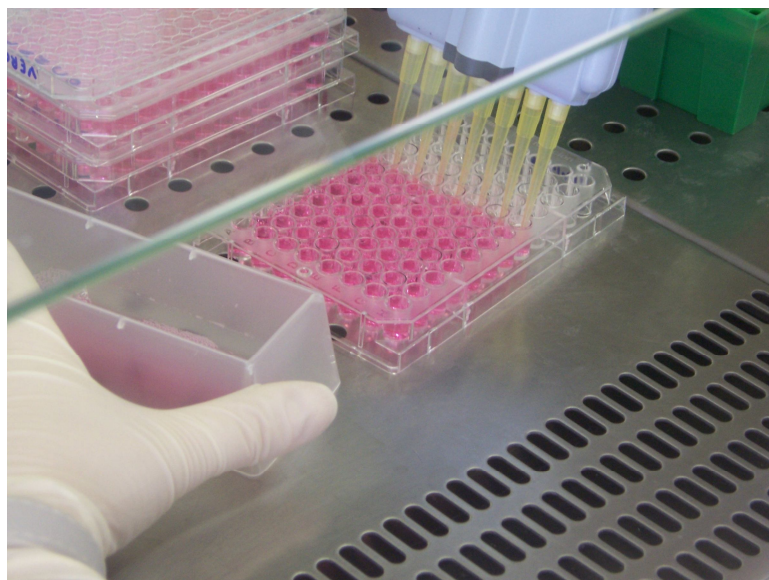
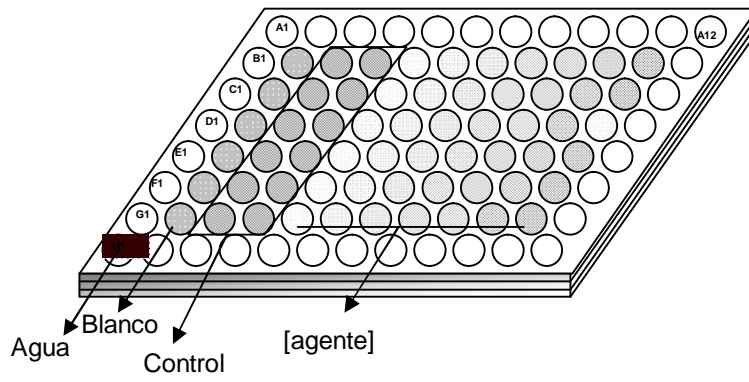
Una vez finalizada la fase de latencia, las células comenzarán su crecimiento exponencial, considerando óptimo este momento para la exposición a las diferentes concentraciones de las sustancias a evaluar.

- Las sustancias cuyo efecto queremos evaluar serán incorporadas a los pocillos (por sextuplicado) diluidas en agua purificada estéril, en un volumen total de 20 µl. La concentración utilizada será diez veces superior a aquella cuyo efecto citotóxico queremos evaluar, ya que el medio de cultivo con el que inicialmente se había efectuado la siembra permanecerá en los pocillos. Se comprobará previamente la osmolaridad de los medios que contengan la sustancia a evaluar y los controles.

En cada placa siempre quedará una columna (6 pocillos sin células) correspondiente al blanco (para eliminar la absorbancia de fondo en la lectura) así como dos columnas (12 pocillos con células) que actuarán como control, y en las cuales añadiremos 20 µl de agua purificada estéril sobre los 180 µl de medio de cultivo.

En estas condiciones permanecerán en incubación durante 24 horas.

Distribución de reactivos en la placa de ensayo:



Ensayo de citotoxicidad. Cultivo en monocapa

Describe las características del ensayo realizado, indicando la composición de cada grupo de pocillos (medios de cultivo, agentes a evaluar, etc.)

