

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,

Sesión 7. Cultivos en monocapa (III). Evaluación de ensayo de citotoxicidad

El objetivo de esta sesión es la evaluación de la citotoxicidad basal por colorimetría tras la exposición del cultivo a un agente químico.

Material adicional: videos.

Evaluación de la citotoxicidad

Una vez comprobado el estado de las células a nivel microscópico, pasaremos a la coloración de las mismas a través de las técnicas de Rojo Neutro y/o MTT. Los pasos a seguir serán los siguientes:

- Retirada del medio sobrenadante de los pocillos*.
- Adición del reactivo correspondiente a cada ensayo:
 - Ensayo de Rojo Neutro: 200 µl de Rojo Neutro (40 µg/ml).
 - Ensayo de MTT: 200 µl de Medio Mínimo Esencial (MEM) con SFB, sin rojo fenol + 50 µl de MTT (5 mg/ml).
- Incubación durante 3 horas en el incubador (37°C).
- Eliminación del reactivo no incorporado a las células*.
- Fijación de las células durante unos minutos con 200 µl de solución formaldehído/CaCl₂ en las placas con Rojo Neutro.
- Extracción del colorante de las células:

<i>MTT</i>	100 µl de DMSO por pocillo
<i>Rojo Neutro</i>	200 µl de solución acético/etanol

* Esta operación se podrá realizar bien de forma manual, con pipeta Pasteur aspirando pocillo por pocillo, o bien de forma automática, mediante una bomba de vacío en cuyo extremo se colocará una pipeta Pasteur. En ambos casos, los residuos irán a un recipiente adecuado (kitasatos con lejía, para medio de cultivo, y kitasatos específico para residuos tóxicos para el MTT y RN).

Después de pasar por el agitador de placas durante 4 y 10 minutos (MTT y Rojo Neutro respectivamente), en condiciones de total oscuridad, efectuaremos las lecturas en espectrofotómetro a las siguientes longitudes de onda:

<i>Placas MTT</i>	570/690 nm
<i>Placas Rojo neutro</i>	560/690 nm

Para eliminar el componente de colorante absorbido en cada placa, se programará el lector espectrofotométrico para que reste de todos y cada uno de los pocillos el resultado correspondiente a la lectura de los pocillos blanco.



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

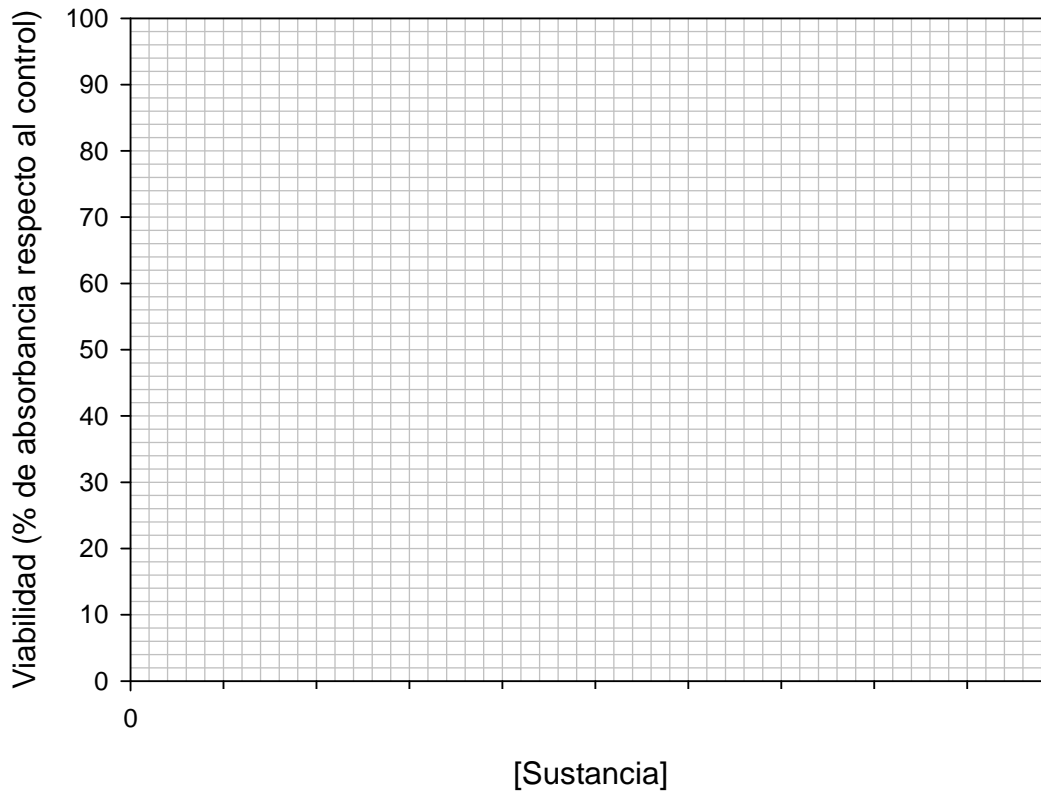
$$\% \text{ supervivencia} = \frac{X \text{ abs colorimet} - X \text{ abs blanco}}{X \text{ abs colorimet control} - X \text{ abs blanco}} \times 100$$

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 mejor ajuste matemático.

Curva dosis-respuesta

Responda a los siguientes ítems:

Cultivo.....Sustancia..... Técnica colorimétrica.....
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