

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)**

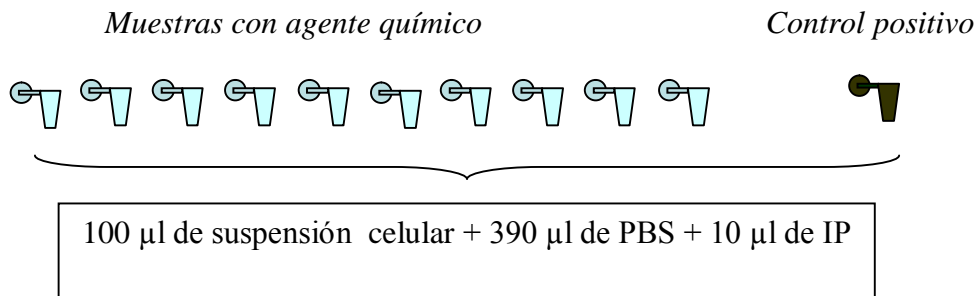
Sesión 8. Cultivos en suspensión (III). Evaluación de la citotoxicidad por citometría de flujo

El objetivo de esta práctica es la evaluación de la citotoxicidad en eritrocitos de ave expuestos a un agente químico, siendo la técnica utilizada la citometría de flujo. Se partirá del material preparado en la sesión 8.

Material adicional: videos.

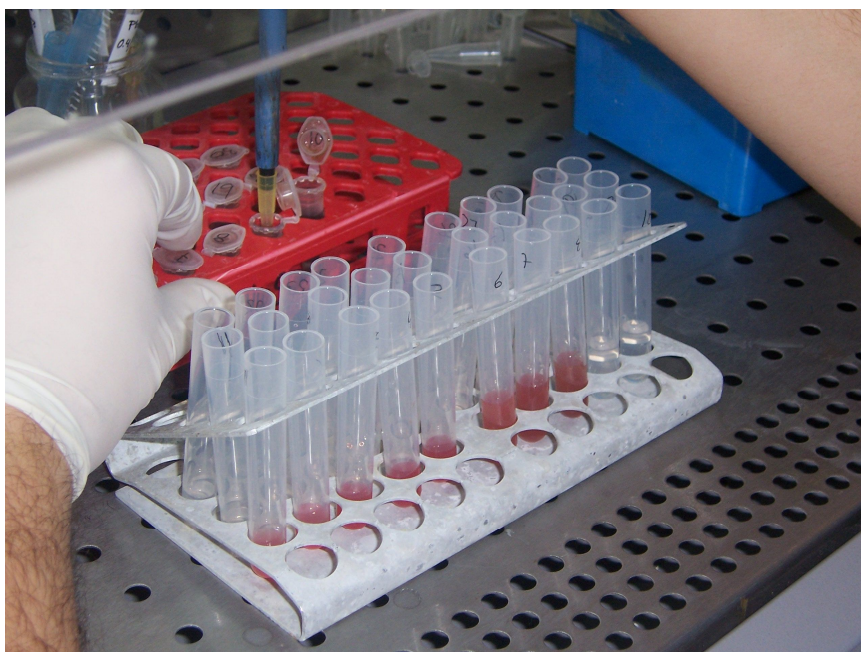
Evaluación de la citotoxicidad

Una vez terminado el tiempo de exposición (24 horas) se toman una alícuota de cada microtubo y se trasvasará a un tubo de citometría, donde además se adicionará el tampón (PBS) y el ioduro de propidio. Del control negativo se preparará además, una muestra sin ioduro de propidio.



Control negativo

- (1) 100 µl de suspensión celular + 390 µl de PBS
- (2) 100 µl de suspensión celular + 390 µl de PBS + 10 µl de IP



Las muestras se mantendrán así durante 10 minutos y en condiciones de temperatura ambiental y oscuridad.

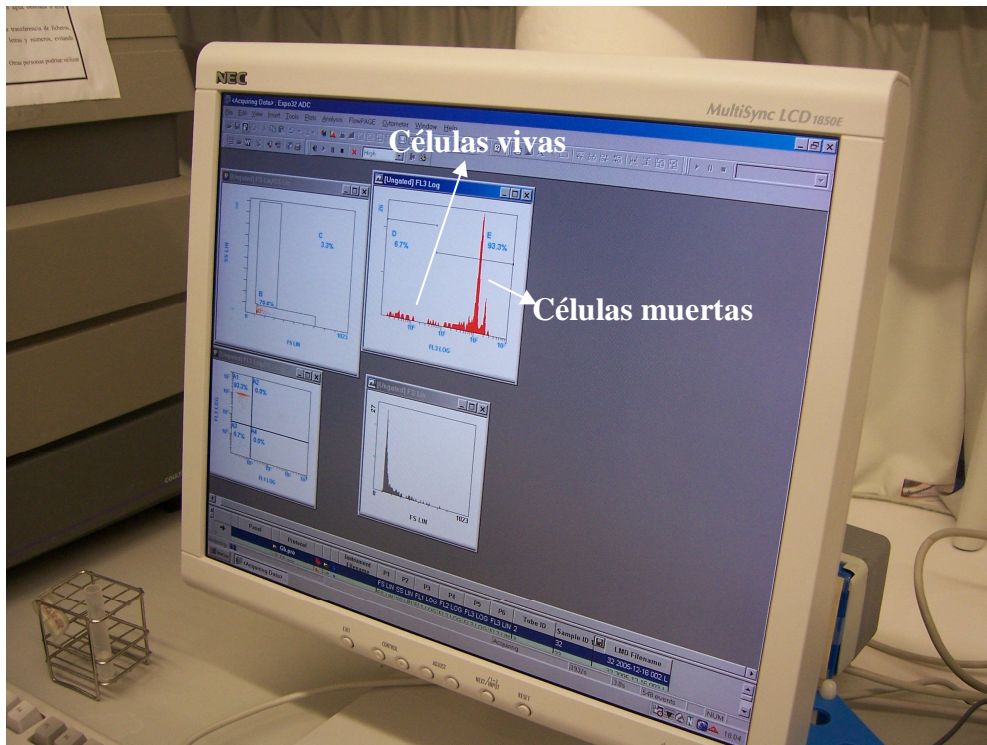
La evaluación de la viabilidad celular mediante esta técnica se realizará a una longitud de onda de 488 nm.

El orden de paso de las muestras por el citómetro de flujo será el siguiente:

- 1) Control negativo, IP negativo: para localización de las células en el histograma de dispersión e histograma de fluorescencia.
- 2) Control positivo, IP+: para ajuste de posición del histograma de fluorescencia.
- 3) Control negativo, IP+: control de viabilidad en células no tratadas con agente químico
- 4) Muestras tratadas, (IP+): comprobación de muerte celular por agente químico



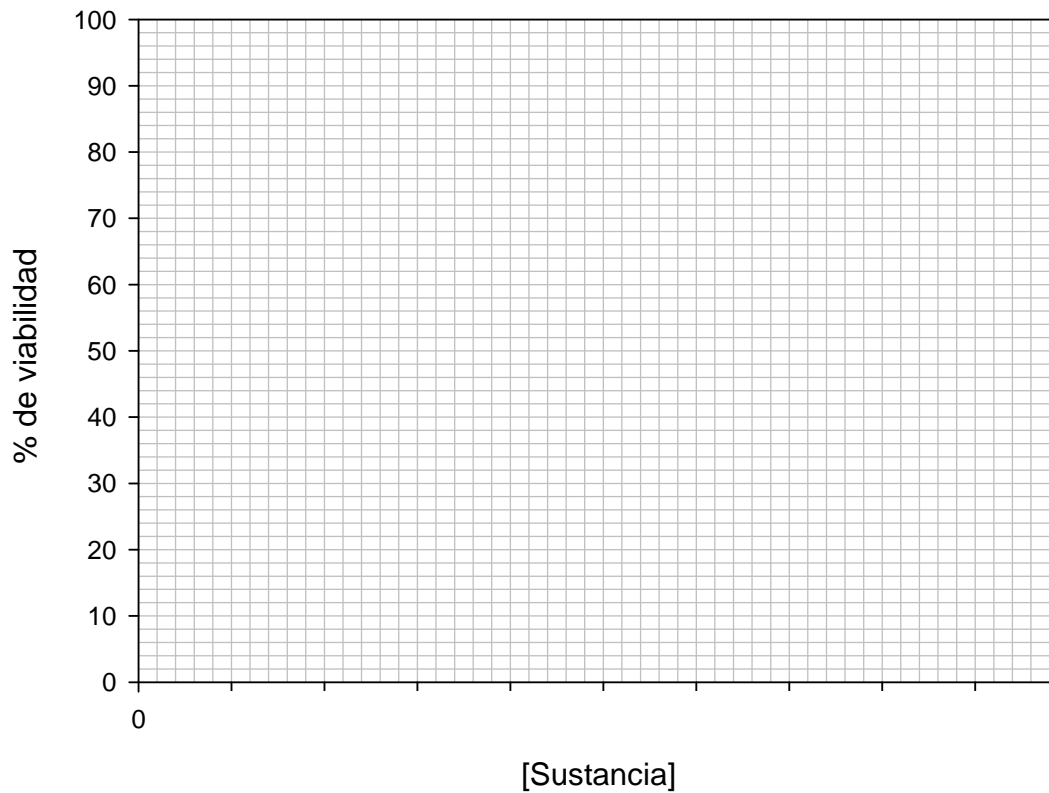
Los resultados recogidos de los histogramas de fluorescencia se corresponden con el porcentaje de células vivas y muertas.



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.