

**IV CONGRESO CIENTÍFICO INTERNACIONAL "EUROCIENCIA JOVEN"**

# **ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN UN CULTIVO CELULAR CYTOTOXICITY ASSAY IN A CELL CULTURE**

***Arenas Córdoba, R.<sup>1</sup>, Santos Núñez, S.<sup>1</sup>, Gutiérrez López, M.P.<sup>1</sup>, Sicilia Zafra, A. G.<sup>2</sup>.***

***<sup>1</sup> Alumnas del Máster de Especialización en Cultivos Celulares.***

***<sup>2</sup> Profesora Coordinadora del IES La Fuensanta de Córdoba.***

***[gema.sicilia@ieslafuensanta.es](mailto:gema.sicilia@ieslafuensanta.es)***

***Curso 24-25***

**IV CONGRESO CIENTÍFICO INTERNACIONAL "EUROCIENCIA JOVEN"**

# ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN UN CULTIVO CELULAR *CYTOTOXICITY ASSAY IN A CELL CULTURE*

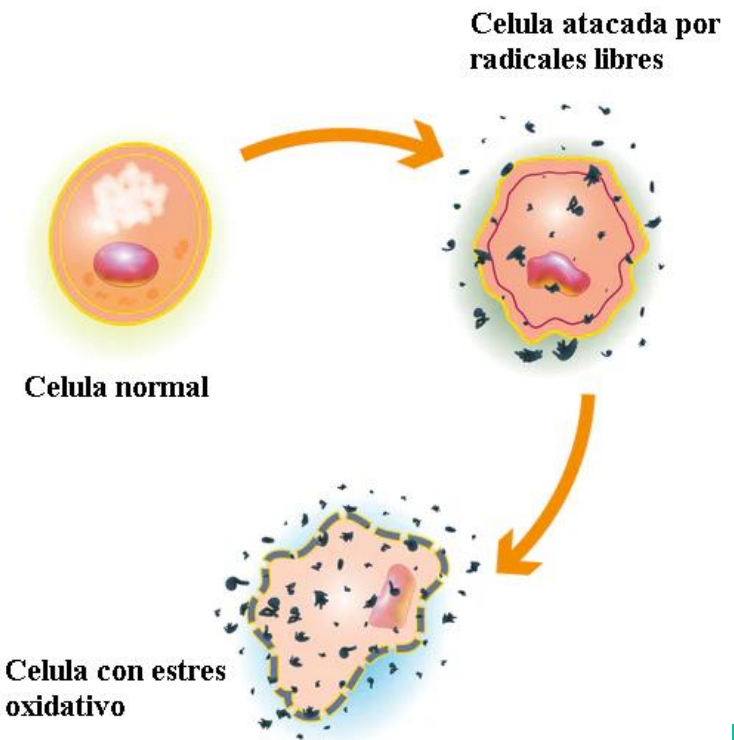
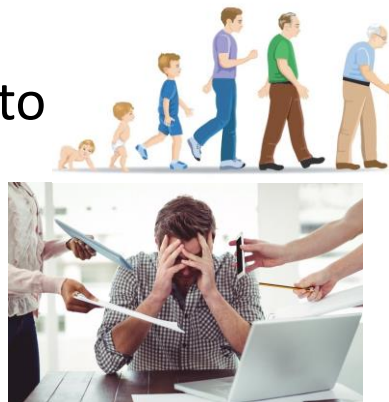
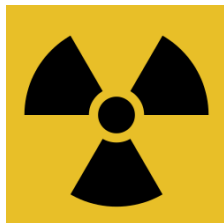


1. INTRODUCCIÓN
2. OBJETIVOS
3. FUDAMENTO TEÓRICO
4. MATERIALES
5. METODOLOGÍA
6. RESULTADOS
7. CONCLUSIÓN
8. BIBLIOGRAFÍA

# 1. INTRODUCCIÓN

## ESTRÉS OXIDATIVO

- Desequilibrio entre ROS y mecanismos de defensa celular
- Causado por ROS  
(*Reactive Oxygen Species*)
- Iones, Radicales libres y PERÓXIDOS
- Factores ambientales
- Estrés
- Envejecimiento



# 1. INTRODUCCIÓN

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO



EQUILIBRIO REDOX

ESTADO DE ESTRÉS  
OXIDATIVO



PROLIFERACIÓN CELULAR  
REPARACIÓN CELULAR

MUERTE CELULAR

PROLIFERACIÓN  
CELULAR  
DESCONTRALADA

APOPTÓISIS    NECROSIS

- Cáncer
- Diabetes
- Enfermedades cardiovasculares
- Enfermedades autoinmunes
- Parkinson
- Alzheimer

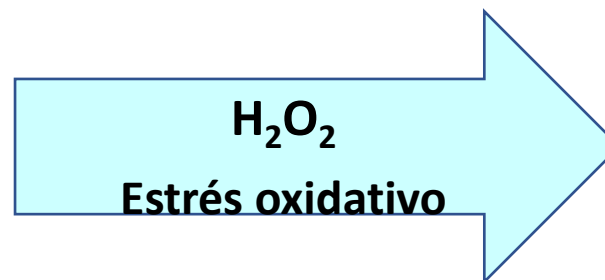
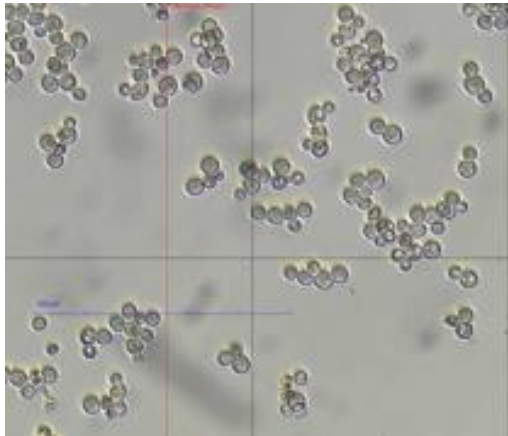
# 1. INTRODUCCIÓN

## ¿POR QUÉ LEVADURAS?

- *Saccharomyces cerevisiae*
- Organismo modelo
- Supervivencia celular

## ¿POR QUÉ $H_2O_2$ COMO TÓXICO?

- Simulamos ESTRÉS OXIDATIVO



- Células vivas
- Células muertas
- Células con pérdida de vitalidad
- Sin capacidad de división
- Disfunción mitocondrial

# 1. INTRODUCCIÓN

## CULTIVO CELULAR

- *Saccharomyces cerevisiae* con 2% glucosa

## TÉCNICA PARA CUANTIFICAR LA VIABILIDAD

- Según la RAE, “viable” significa: adj. *Biol.* Que puede vivir.

- Reactivo Alamar Blue™

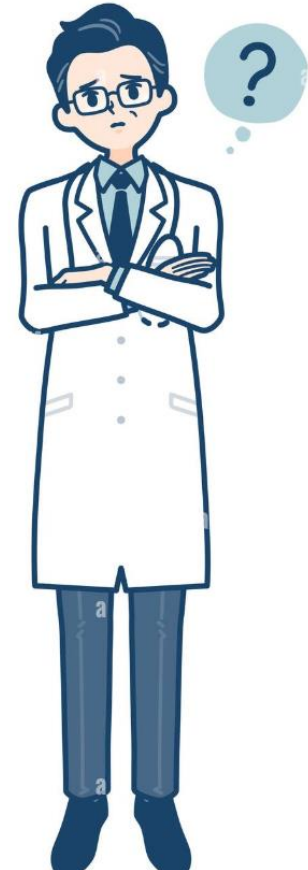


# 1. INTRODUCCIÓN

## PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA



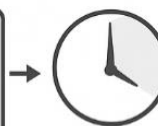
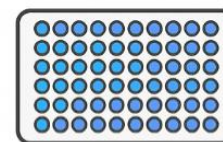
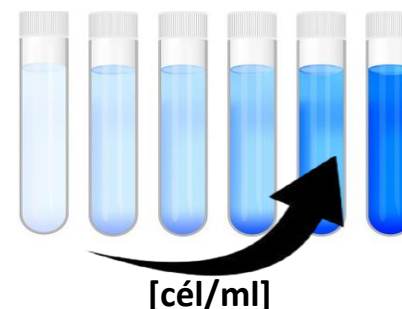
- *¿QUÉ CONCENTRACIÓN CELULAR USAMOS?*
- *¿POR QUÉ?*
- *¿CUÁNTO TIEMPO DE INCUBACIÓN NECESITA EL REACTIVO?*



## 2. OBJETIVOS

### 1) Ensayo de viabilidad

- Determinar la concentración celular óptima
  - Ensayo in vitro con concentraciones crecientes de células
  - En diferentes tiempos



12h  
24h  
48h

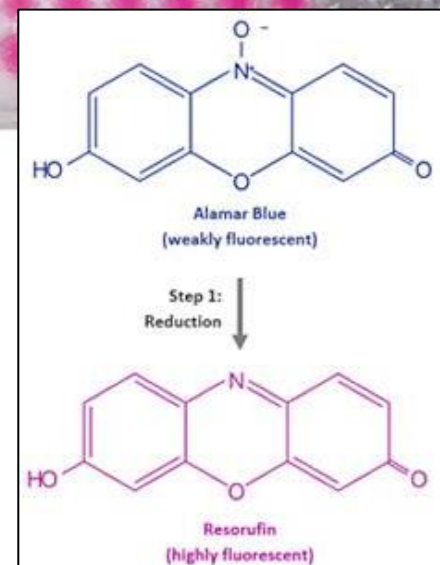
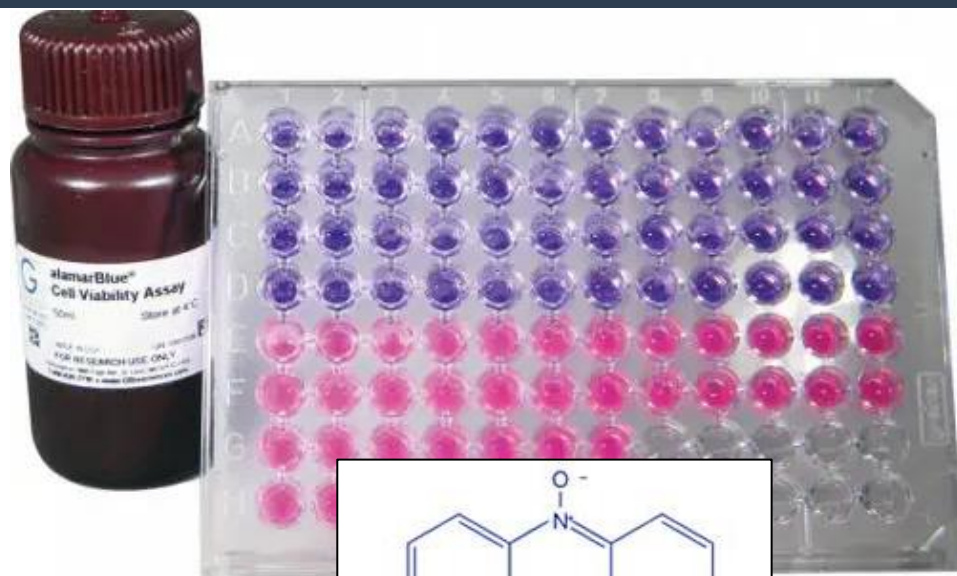
### 2) Ensayo de citotoxicidad con peróxido de hidrógeno

- Cuantificar la toxicidad del compuesto  $H_2O_2$ 
  - Ensayo in vitro con concentraciones crecientes de tóxico

# 3. FUNDAMENTO TEÓRICO

## REACTIVO ALAMAR BLUE™

- Colorante vital
- Indicador redox
- Reactivo básico – **RESAZURINA**
- No tóxico
- Permeable a las células
- Color **AZUL** NO FLUORESCENTE



En presencia de actividad celular:

- Se reduce irreversiblemente a **RESORUFINA**
- Color **ROSA-ROJO** FLUORESCENTE

### 3. FUNDAMENTO TEÓRICO

## REACTIVO ALAMAR *BLUE*<sup>TM</sup>

### TABLA COMPARATIVA

|                         | Resazurina            | Resorufina                                  |
|-------------------------|-----------------------|---------------------------------------------|
| Estado de oxidación     | Oxidado               | Reducido                                    |
| Color                   | Azul                  | Rosa                                        |
| Fluorescencia           | Muy baja o nula       | Alta                                        |
| Longitud de onda medida | 600 nm                | 570 nm                                      |
| Estabilidad             | Relativamente estable | Inestable a larga exposición de luz o calor |

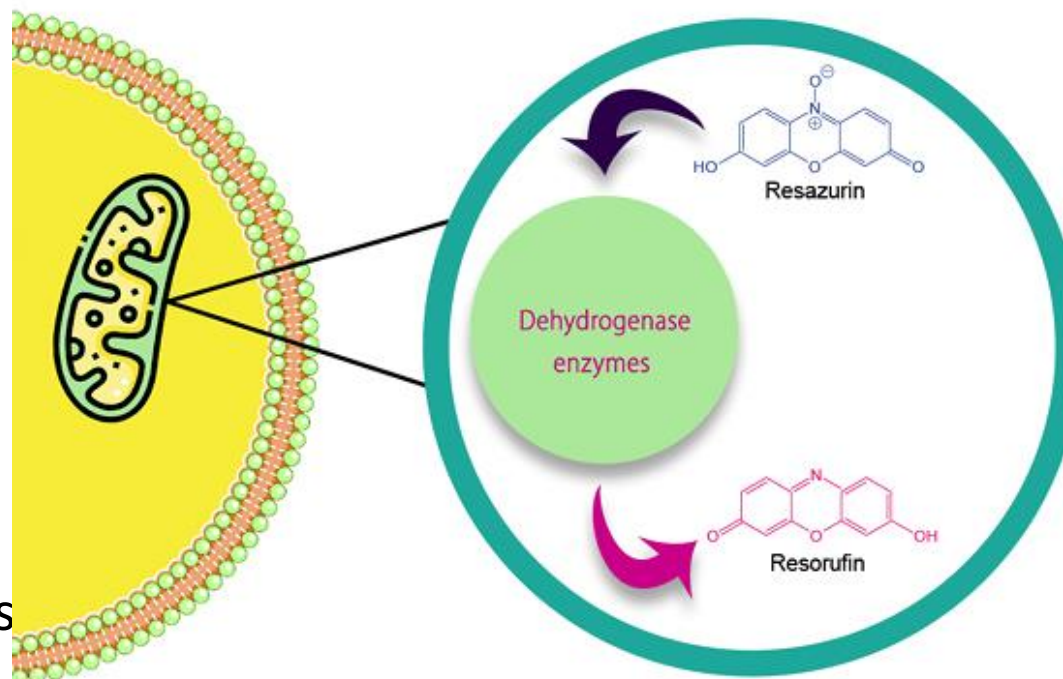
# 3. FUNDAMENTO TEÓRICO

## REACTIVO ALAMAR BLUE™

### MECANISMO

- ACTIVIDAD METABÓLICA
- Lactato deshidrogenasa (LDH) en mitocondrias
- Metabolizan la resazurina
- Señal de fluorescencia cuantificable
- ↑ Fluorescencia    ↑ Cél. viables

- Células viables ✓
- Células muertas ✗

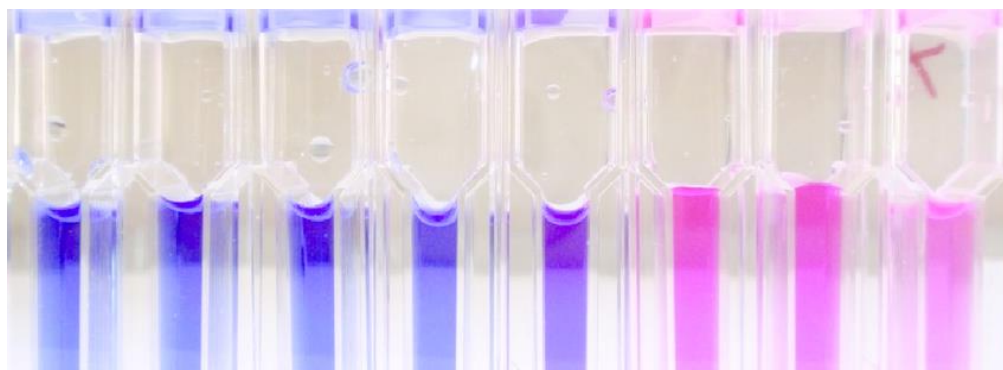


### 3. FUNDAMENTO TEÓRICO

## REACTIVO ALAMAR *BLUE*<sup>TM</sup>

### MECANISMO

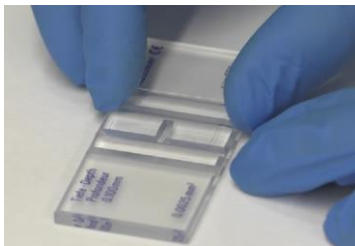
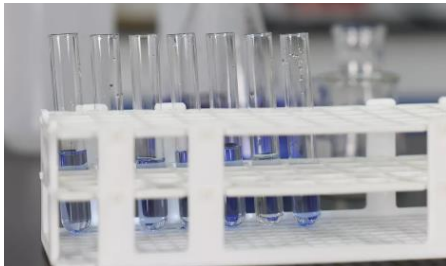
- ↑ Intensidad color    ↑ Células viables



Espectrofotómetro (Absorbancia)

# 4. MATERIALES

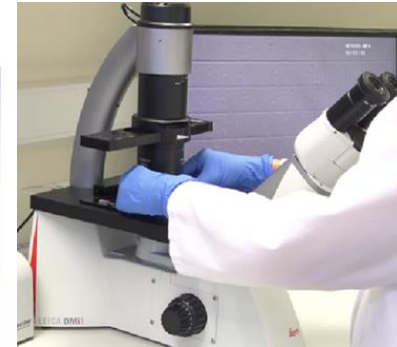
## Materiales



## Reactivos



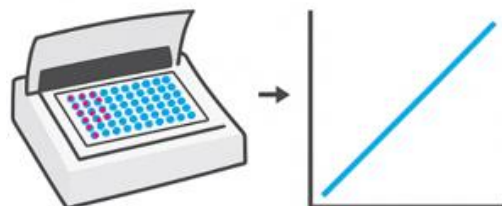
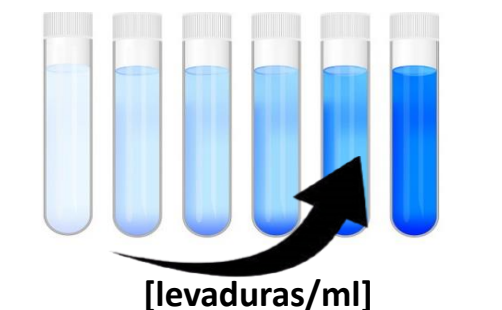
## Equipos



# 5. METODOLOGÍA

## VISTA GENERAL DE LOS MÉTODOS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS

### 1) ENSAYO DE VIABILIDAD



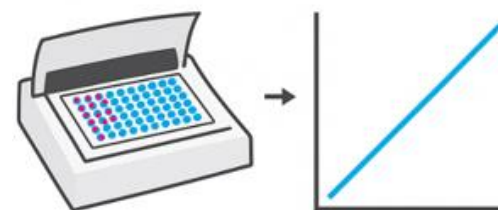
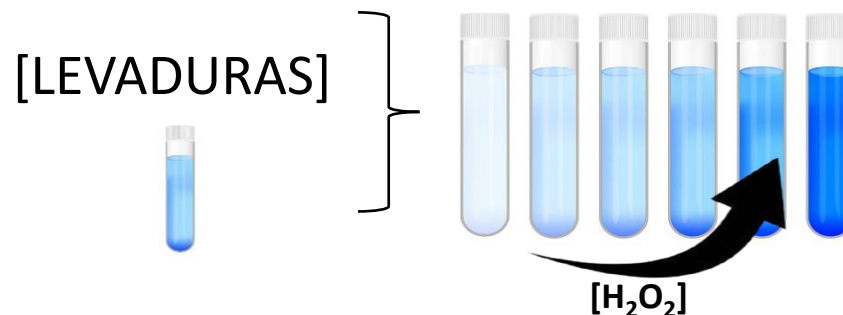
- [LEVADURAS]



- TIEMPO INCUBACIÓN



### 2) ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

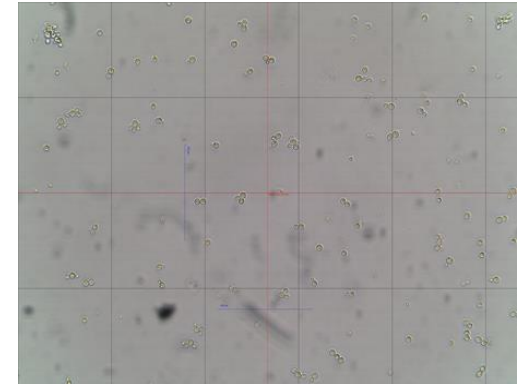


- ↑CITOTOXICIDAD ↓ VIABILIDAD

# 5. METODOLOGÍA

## 1) ENSAYO DE VIABILIDAD

1. Suspensión de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) en medio de cultivo con 2 % de glucosa.
2. Incubación y recuento en cámara de Neubauer y % de viabilidad.
3. Preparar batería de tubos de ensayo con concentraciones crecientes de levaduras en un rango de **2.000 – 500.000 cél/ml**



# 5. METODOLOGÍA

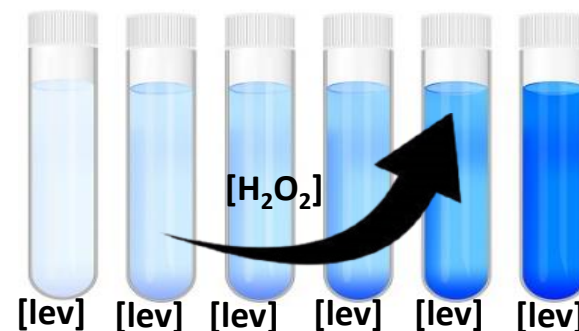
## 1) ENSAYO DE VIABILIDAD

4. Añadir a cada tubo un 10 % de Alamar Blue (Resazurina)
5. Incubamos a 28°C en ausencia de luz
6. Medimos **Absorbancia** a **570 nm** y **600 nm**. Realizamos  $A_{570} - A_{600}$  para cada muestra .
7. Se mide a 570 nm y 600 nm a **12** horas, **24** horas, **48** horas.

# 5. METODOLOGÍA

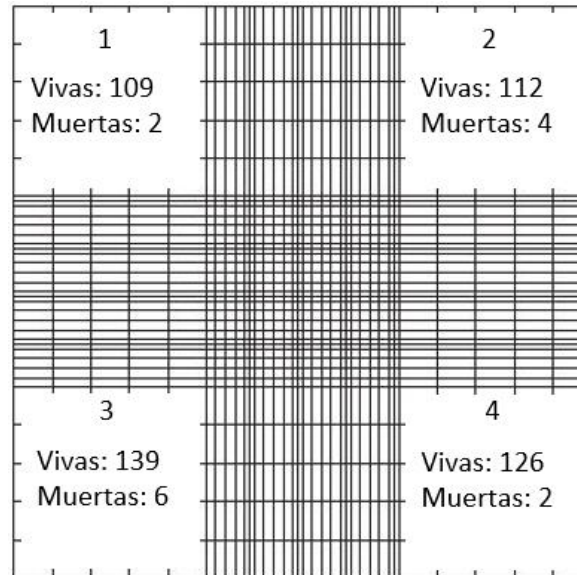
## 2) ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

1. Levaduras y recuento. Ya conocemos la concentración óptima para el ensayo.
2. Preparar batería de tubos de ensayo con concentraciones crecientes de agua oxigenada de 0,05 – 20 mM.
3. Añadir a cada tubo un 10 % de Alamar Blue
4. Incubamos a 28°C en ausencia de luz
5. Medimos **Absorbancia** a **570 nm** y **600 nm**. Realizamos  $A_{570} - A_{600}$  para cada muestra .
6. Se mide a 570 nm y 600 nm a **12 horas**, **24 horas**, **48 horas**.



# 6. RESULTADOS

## RECuento CELULAR



|                 |     |
|-----------------|-----|
| Células totales | 500 |
| Células vivas   | 486 |
| Células muertas | 14  |

$$cél/ml = \frac{500 \text{ células}}{4 \text{ cuadrantes}} \cdot 10^4 = 1250000 \text{ cél/ml} = 1,25 \cdot 10^6 \text{ cél/ml}$$

$$\% \text{ Viabilidad} = 97,2 \%$$

$$C \cdot V = C' \cdot V'$$

# 6. RESULTADOS

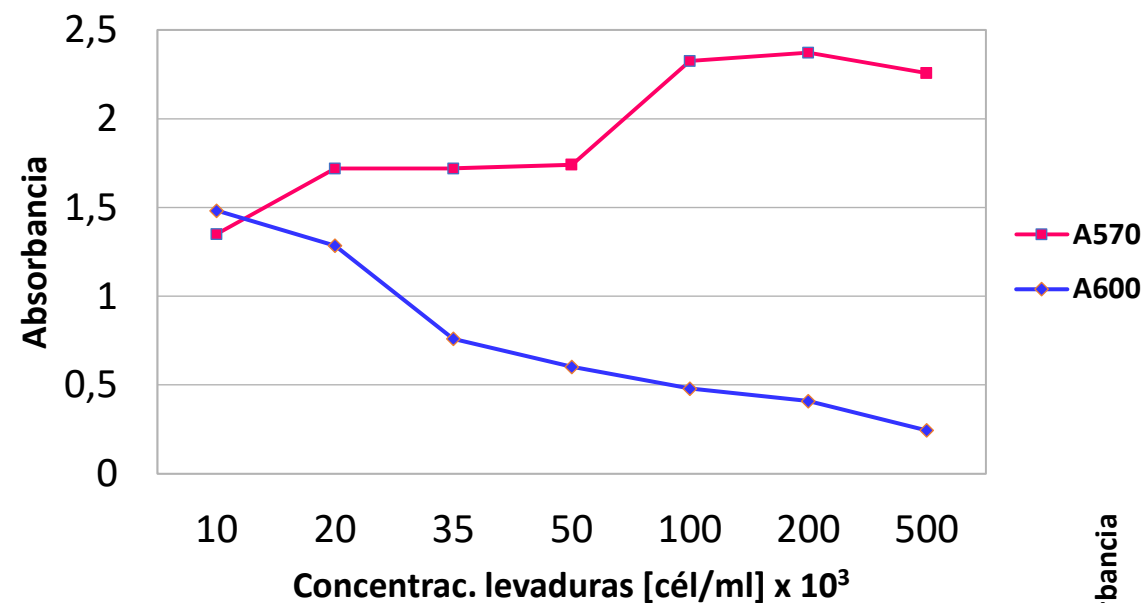
## VIABILIDAD

| Levaduras<br>(cél/ml) | A <sub>570</sub> | A <sub>600</sub> | A <sub>570</sub> <sup>-</sup><br>A <sub>600</sub> |
|-----------------------|------------------|------------------|---------------------------------------------------|
| 10 x 10 <sup>3</sup>  | 1,35             | 1,482            | -0,132                                            |
| 20 x 10 <sup>3</sup>  | 1,719            | 1,285            | 0,434                                             |
| 35 x 10 <sup>3</sup>  | 1,72             | 0,76             | 0,96                                              |
| 50 x 10 <sup>3</sup>  | 1,74             | 0,602            | 1,138                                             |
| 100 x 10 <sup>3</sup> | 2,326            | 0,48             | 1,846                                             |
| 200 x 10 <sup>3</sup> | 2,373            | 0,409            | 1,964                                             |
| 500 x 10 <sup>3</sup> | 2,257            | 0,244            | 2,013                                             |

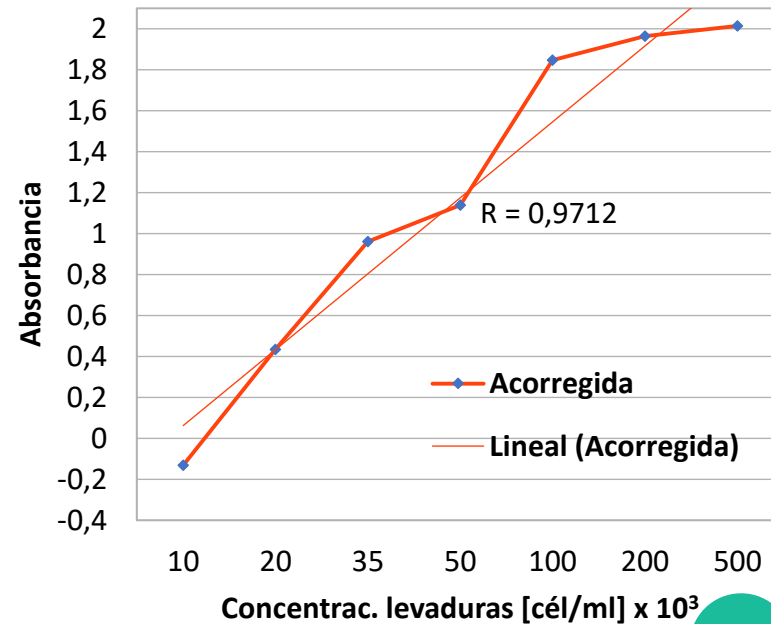


# 6. RESULTADOS

## VIABILIDAD



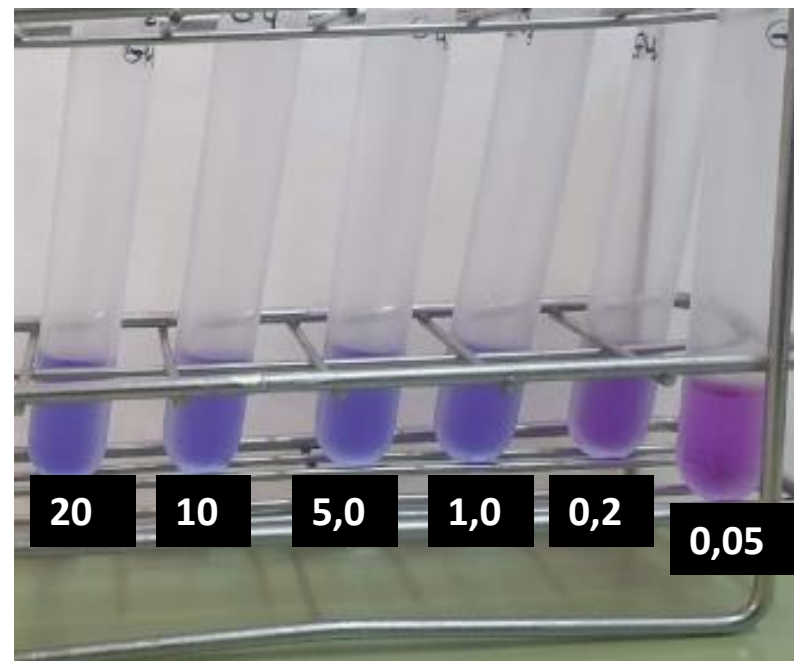
## Coeficiente correlación "R"



## 6. RESULTADOS

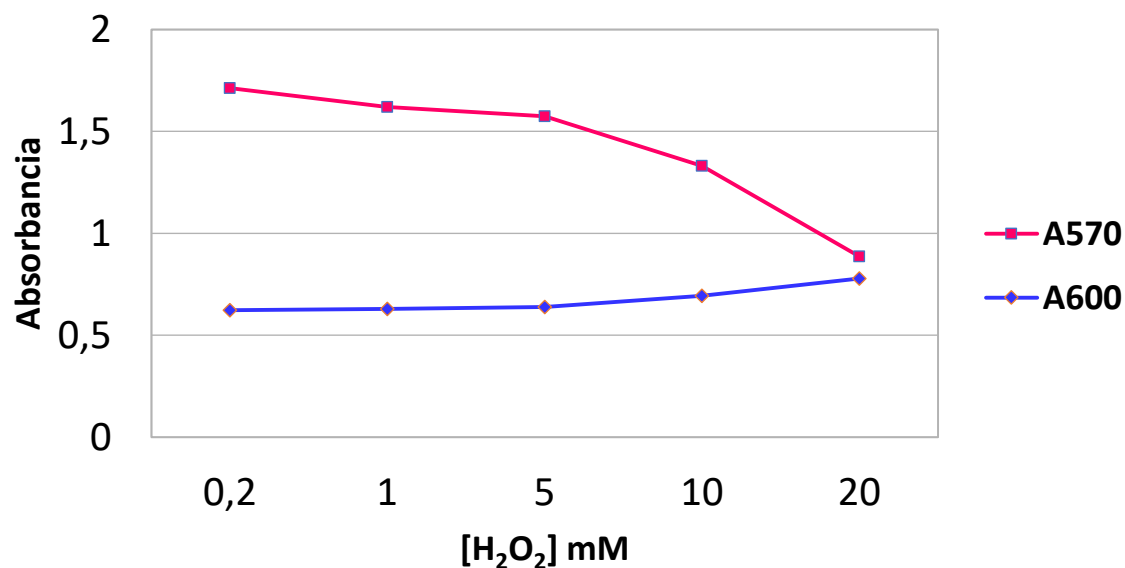
### CITOTOXICIDAD

| [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (mM) | A <sub>570</sub> | A <sub>600</sub> | A <sub>570</sub> -A <sub>600</sub> |
|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------------------------|
| 0,05                                  | 1,75             | 0,615            | 1,135                              |
| 0,2                                   | 1,712            | 0,622            | 1,09                               |
| 1                                     | 1,62             | 0,629            | 0,991                              |
| 5                                     | 1,574            | 0,638            | 0,936                              |
| 10                                    | 1,331            | 0,694            | 0,637                              |
| 20                                    | 0,887            | 0,778            | 0,109                              |

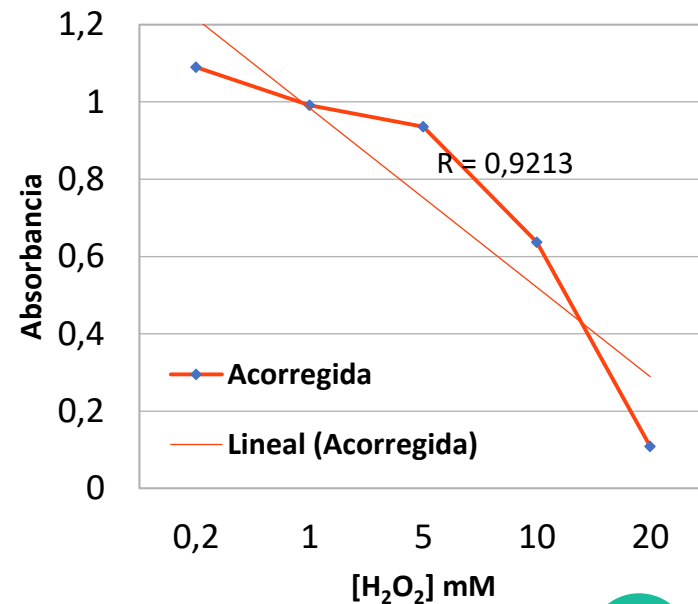


# 6. RESULTADOS

## CITOTOXICIDAD



## Coeficiente correlación "R"



# 6. CONCLUSIÓN

## CANTIDAD DE CÉLULAS ÓPTIMA

- A mitad de la curva de calibración:

$50 \times 10^3$  células

## RANGO DE ABSORBANCIAS

0,1 – 2 A

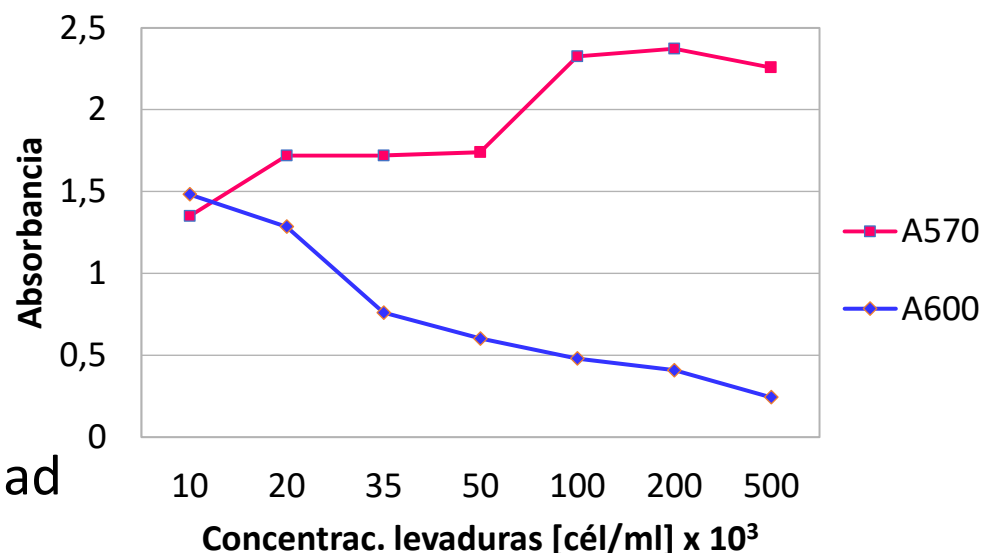
## TIEMPO DE INCUBACIÓN

- Más de 24 horas
- A mayor tiempo, más sensibilidad
- Se vuelve incoloro

## TEMPERATURA DE INCUBACIÓN

- 4°C se relentiza

### VIABILIDAD



# 6. CONCLUSIÓN

## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> COMO TÓXICO

- Importancia concentración celular y tiempo de incubación

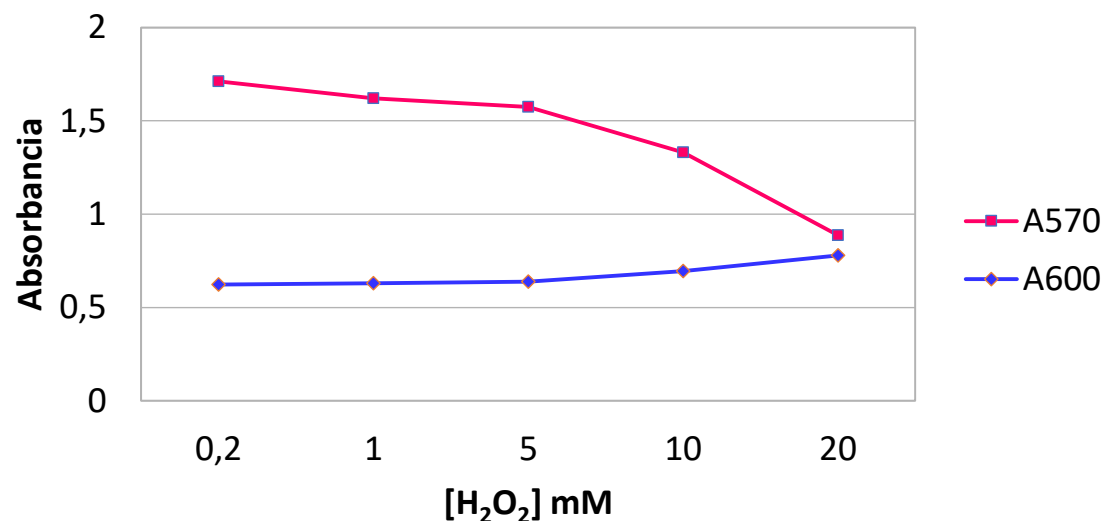
## EFFECTO ESTRÉS OXIDATIVO

- A partir de 5mM

## RESAZURINA

- Viabilidad y citotoxicidad
- Reproducible

### CITOTOXICIDAD



# 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. Hum Reprod. 2007 May;22(5):1304-9. doi: 10.1093/humrep/dem011. Epub 2007 Feb 16. PMID: 17307808.
2. Rodriguez-Corrales JA, Josan JS (2017) Resazurin live cell assay: setup and fine-tuning for reliable cytotoxicity results. Methods Mol Biol 1647:207-219.
3. Autoría: Monitoring cell health with alamarBlue and PrestoBlue reagents using the Varioskan LUX Multimode Microplate Reader © 2018 Thermo Fisher Scientific.
4. The latest antifungal options. Lower cost per test. © 2024 Thermo Fisher Scientific.
5. Johnson, E.M. Issues in antifungal susceptibility testing. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008; 61 Suppl. 1:i13.
6. Sensititre YeastONE for in vitro diagnostic use. [www.trekds.com/techinfo](http://www.trekds.com/techinfo).
7. Longhin EM, El Yamani N, Rundén-Pran E, Dusinska M. The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. Front Toxicol. 2022 Sep 28;4:981701. doi: 10.3389/ftox.2022.981701. PMID: 36245792; PMCID: PMC9554156.
8. O'Brien, J.; Wilson, I.; Ortón, T.; et al. Investigación del tinte fluorescente Alamar Blue (resazurina) para la evaluación de la citotoxicidad de células de mamíferos. EUR. J. bioquímica. 2000, 267, 5421. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>

# **GRACIAS POR SU ATENCIÓN**

**CURSO DE  
ESPECIALIZACIÓN EN  
CULTIVOS CELULARES**



**TÍTULO DE MASTER DE FP**



*Edificios del I.E.S. "La Fuensanta"*

***rosario.a.c170@gmail.com***

**IV CONGRESO CIENTÍFICO  
INTERNACIONAL  
"EUROCIENCIA JOVEN"**

**IES "LA FUENSANTA"  
CÓRDOBA**

