



IV CONGRESO CIENTÍFICO INTERNACIONAL "EUROCIENCIA JOVEN"

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN UN CULTIVO CELULAR

CYTOTOXICITY ASSAY IN A CELL CULTURE

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

¹ Alumnas del Máster de Especialización en Cultivos Celulares.

² Profesora Coordinadora del IES La Fuensanta de Córdoba.

gema.sicilia@ieslaufuensanta.es

Curso 24-25

ÍNDICE



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

1. INTRODUCCIÓN

CITOTOXICIDAD

- Según la RAE, “toxicidad” significa: *f.* Grado de efectividad de una sustancia tóxica.
- Según la RAE, “viable” significa: *adj. Biol.* Que puede vivir.



TÉCNICA PARA CUANTIFICAR LA VIABILIDAD

- Reactivo Alamar Blue™



1. INTRODUCCIÓN



PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA



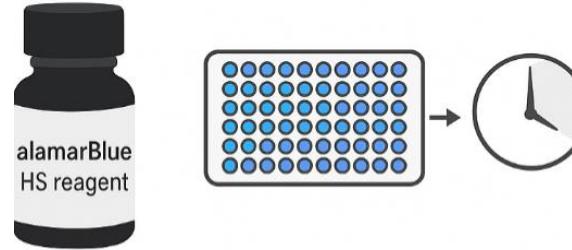
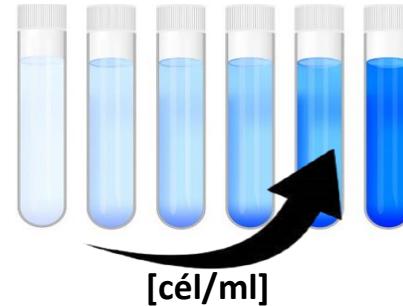
- ***¿QUÉ CONCENTRACIÓN USAMOS?***
- ***¿POR QUÉ?***
- ***¿CUÁNTO TIEMPO DE INCUBACIÓN NECESITA EL COLORANTE?***



2. OBJETIVOS

1) Ensayo de viabilidad

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



2) Ensayo de citotoxicidad con agua oxigenada

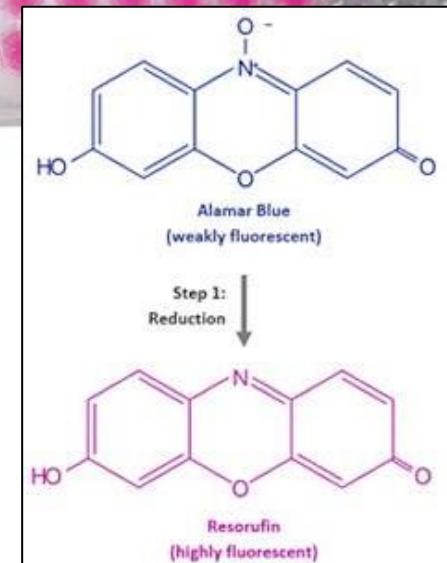
- Cuantificar la toxicidad del compuesto H_2O_2
 - Ensayo *in vitro* con concentraciones crecientes de tóxico

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™

TABLA COMPARATIVA

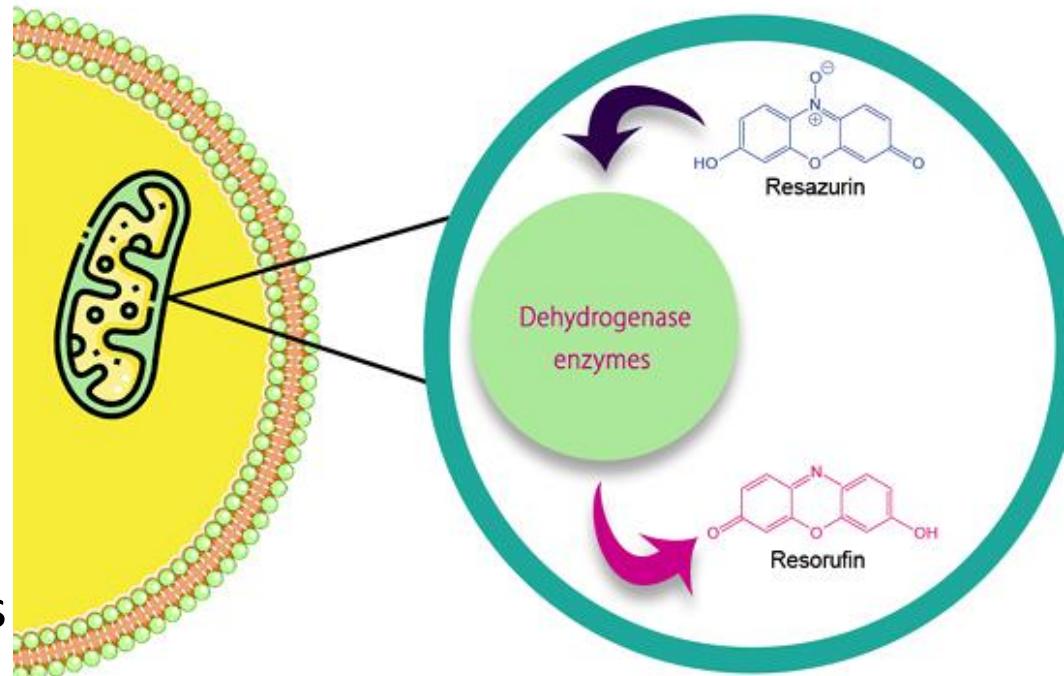
	Resazurina	Resorufina
Estado de oxidación	Oxidado	Reducido
Color	Azul	Rosa
Fluorescencia	Muy baja o nula	Alta
Longitud de onda medida	600 nm	570 nm
Estabilidad	Relativamente estable	Inestable a larga exposición de luz o calor

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 ✗

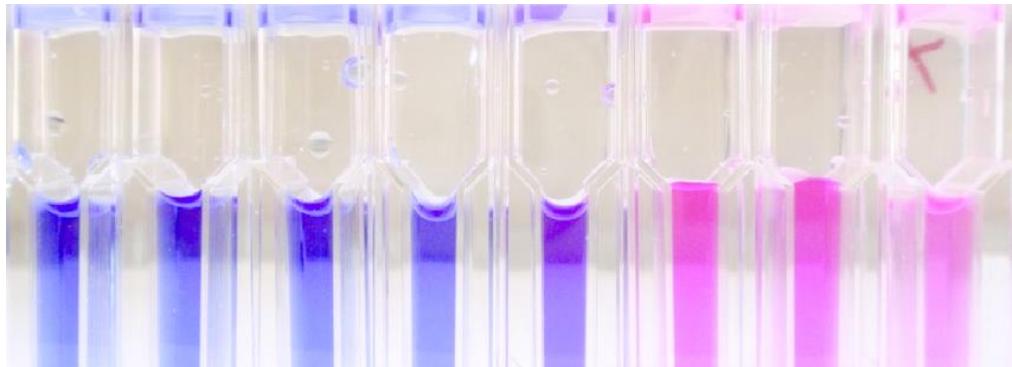


3. FUNDAMENTO TEÓRICO

REACTIVO ALAMAR BLUE™

MECANISMO

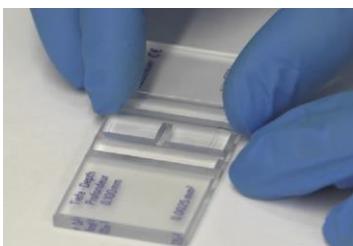
- ■ Fluorescencia ■ Cél. Viables



Espectrofotómetro (Absorbancia)

4. MATERIALES

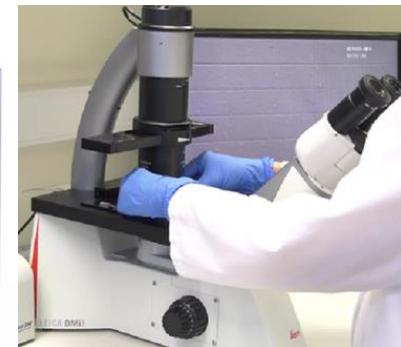
Materiales



Reactivos



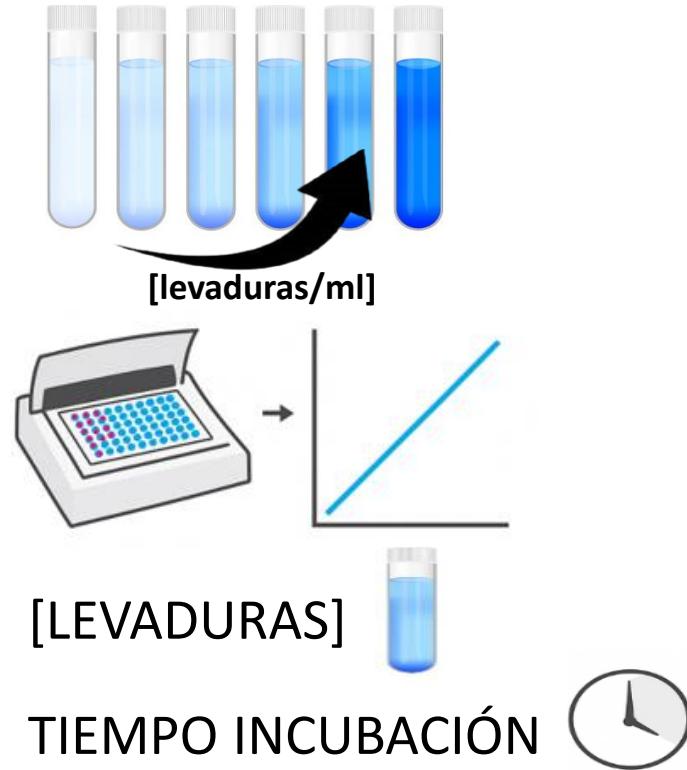
Equipos



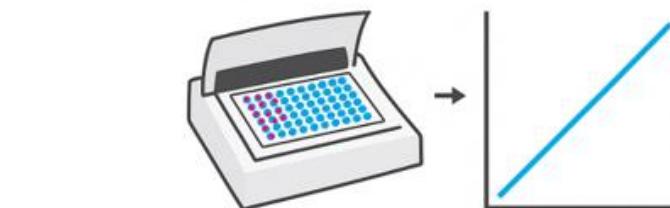
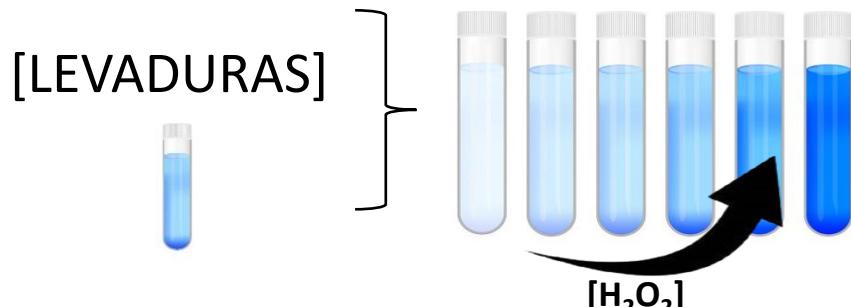
5. METODOLOGÍA

VISTA GENERAL DE LOS MÉTODOS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS

1) ENSAYO DE VIABILIDAD



2) ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

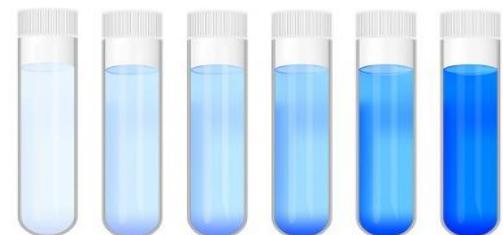
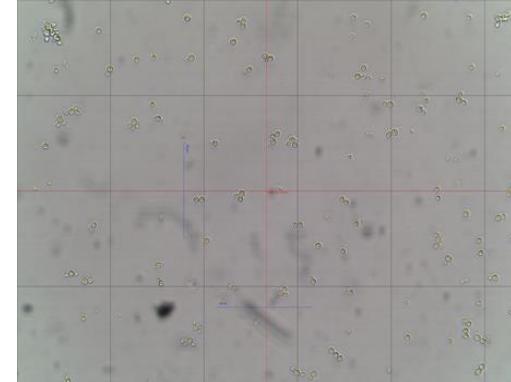


↑CITOTOXICIDAD - ↓ VIABILIDAD

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

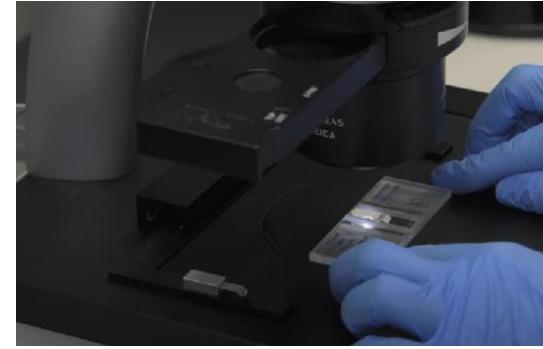
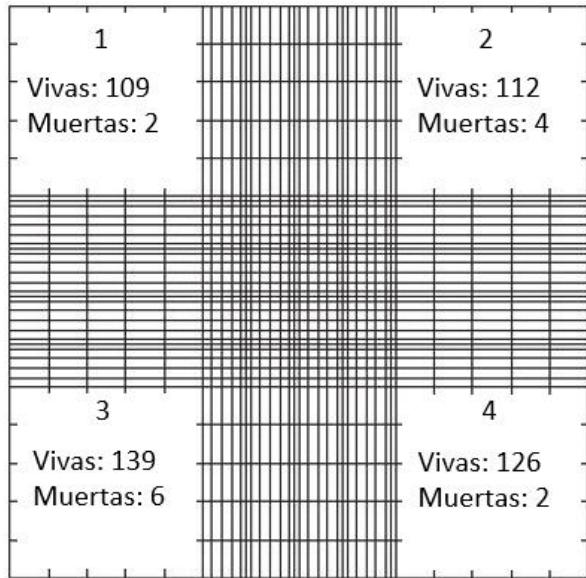


2) ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

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 (Resazurina)
4. Incubamos a 28ºC 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

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

% Viabilidad = 97,2 %

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

6. RESULTADOS

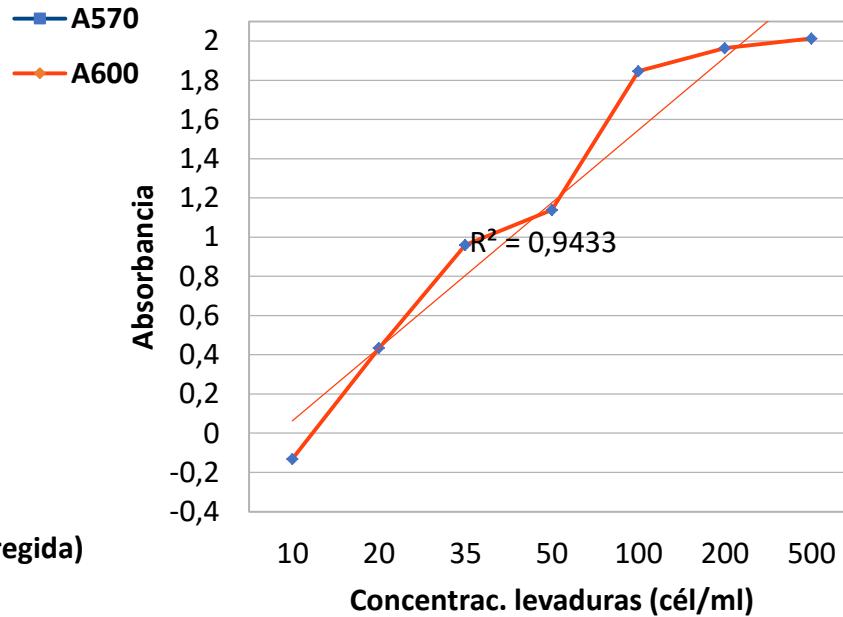
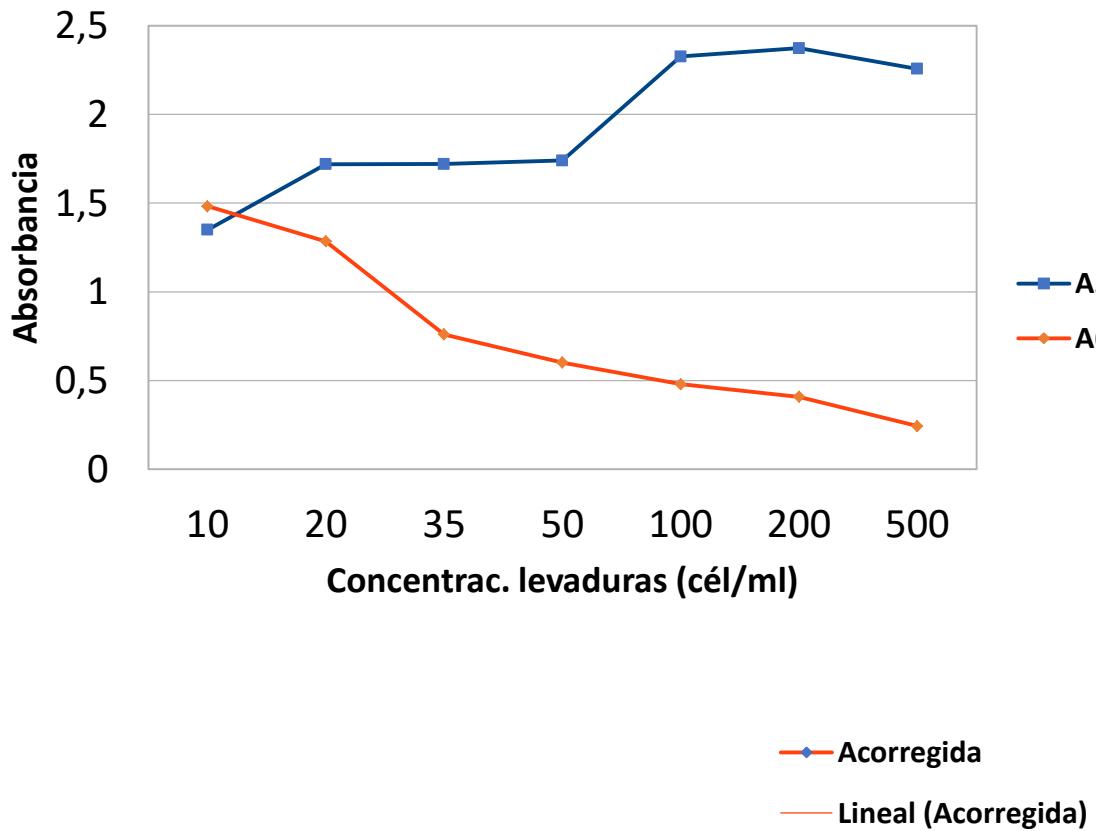
VIABILIDAD

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



6. RESULTADOS

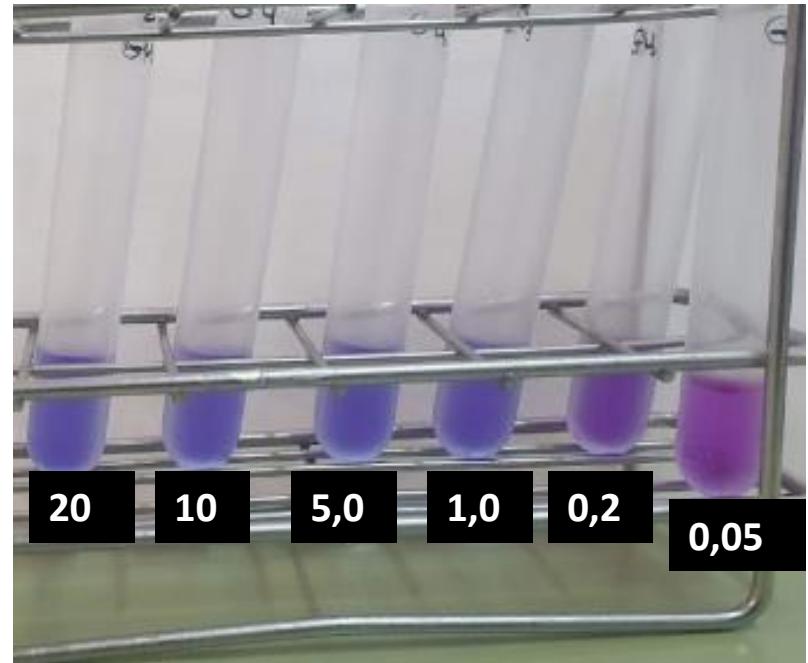
VIABILIDAD



6. RESULTADOS

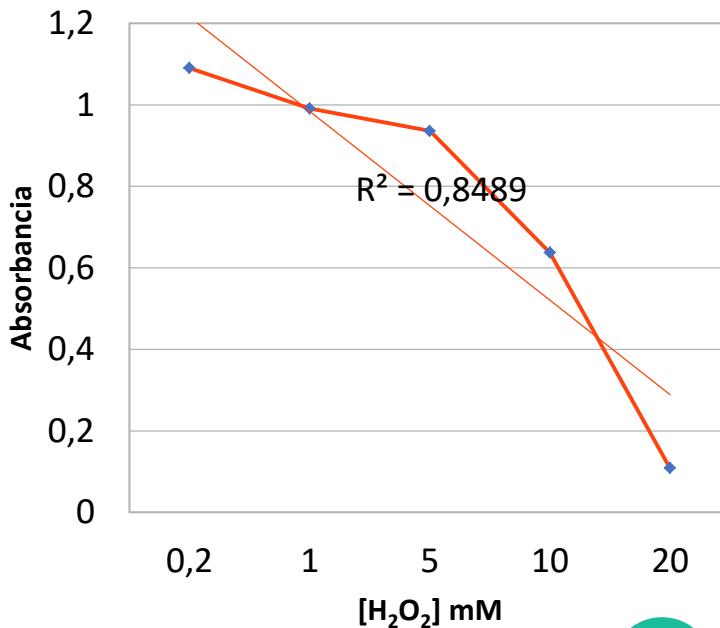
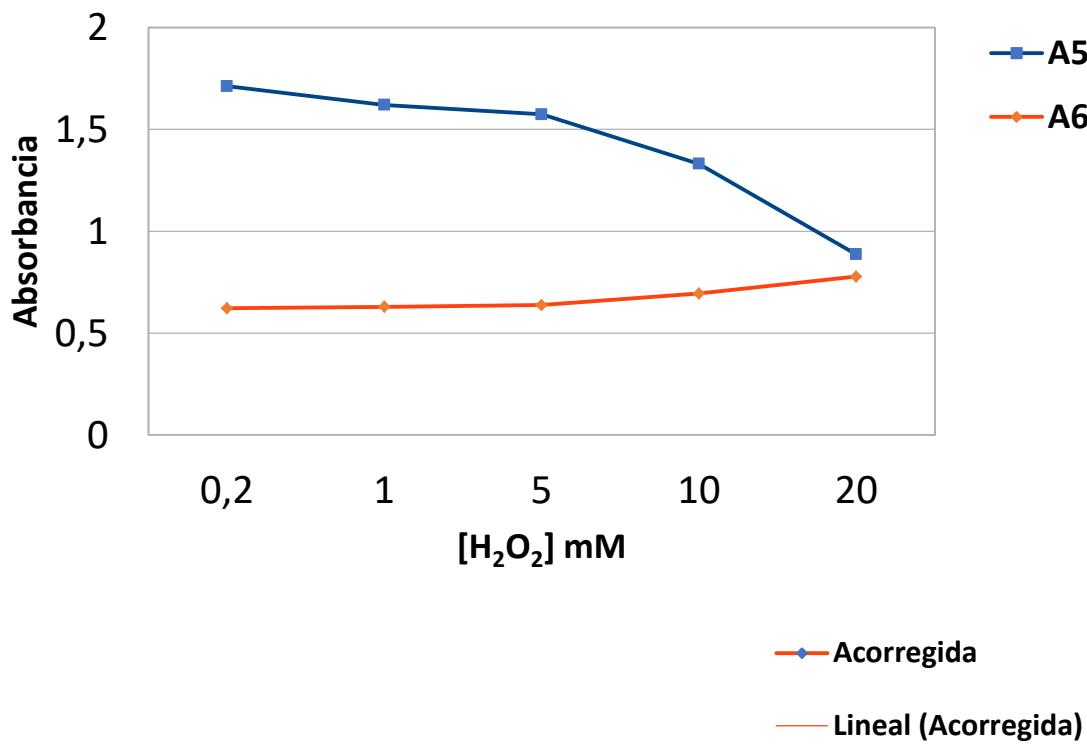
CITOTOXICIDAD

[H ₂ O ₂] (mM)	A ₅₇₀	A ₆₀₀	A ₅₇₀ -A ₆₀₀
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



6. CONCLUSIÓN

CANTIDAD DE CÉLULAS

- A mitad de la curva de calibración: 50×10^3 células

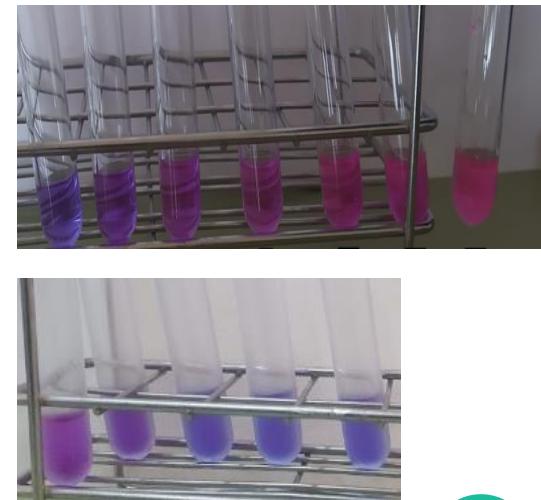
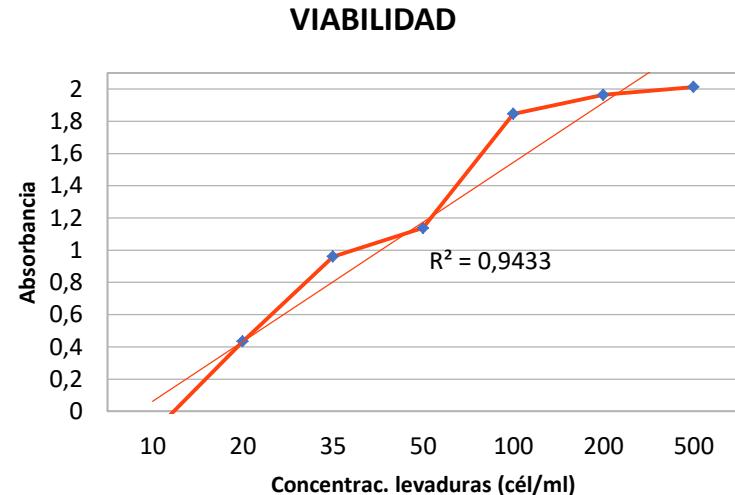
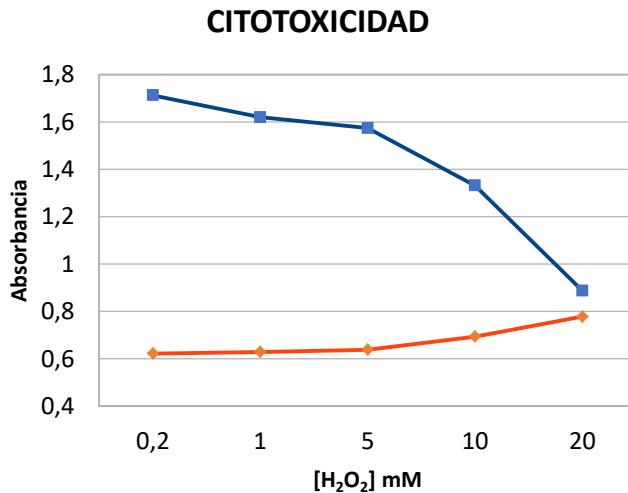
TIEMPO DE INCUBACIÓN

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

TEMPERATURA DE INCUBACIÓN

- 4°C parada

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.
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"

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

**IES "LA FUENSANTA"
CÓRDOBA**

