

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@ieslafuensanta.es

Curso 24-25

1. INTRODUCCIÓN
2. OBJETIVOS
3. FUDAMENTO 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™

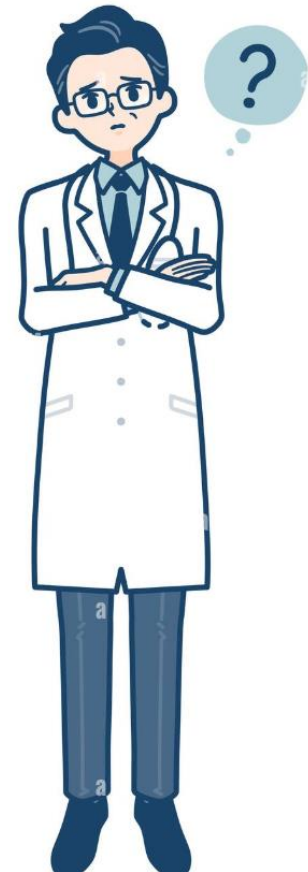


1. INTRODUCCIÓN

PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA



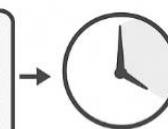
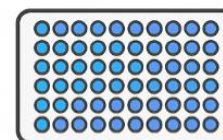
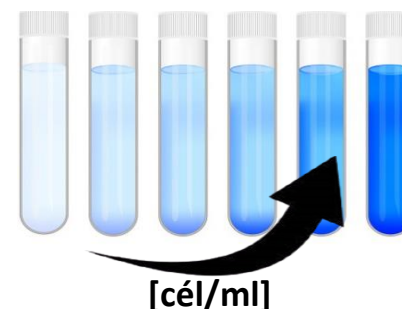
- ***¿QUÉ CONCENTRACIÓN USAMOS?***
- ***¿POR QUÉ?***
- ***¿CUÁNTO TIEMPO DE INCUBACIÓN NECESITA EL COLORANTE?***



2. OBJETIVOS

1) Ensayo de viabilidad

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



12h
24h
48h

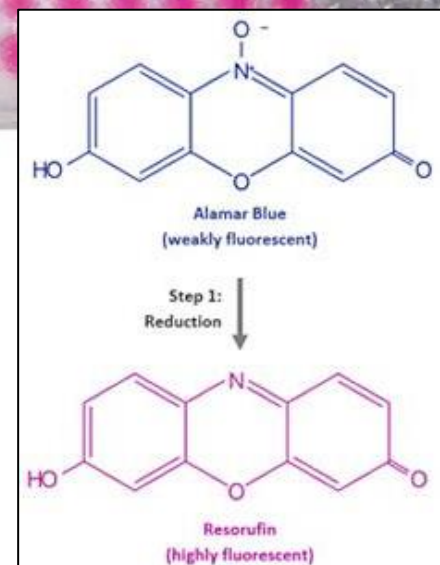
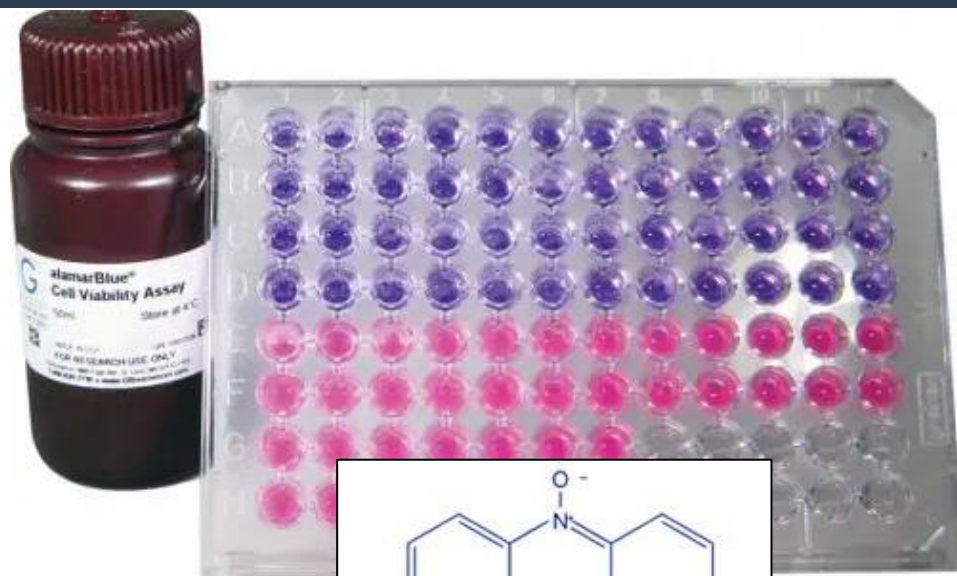
2) Ensayo de citotoxicidad con agua oxigenada

- 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*TM

TABLA COMPARATIVA

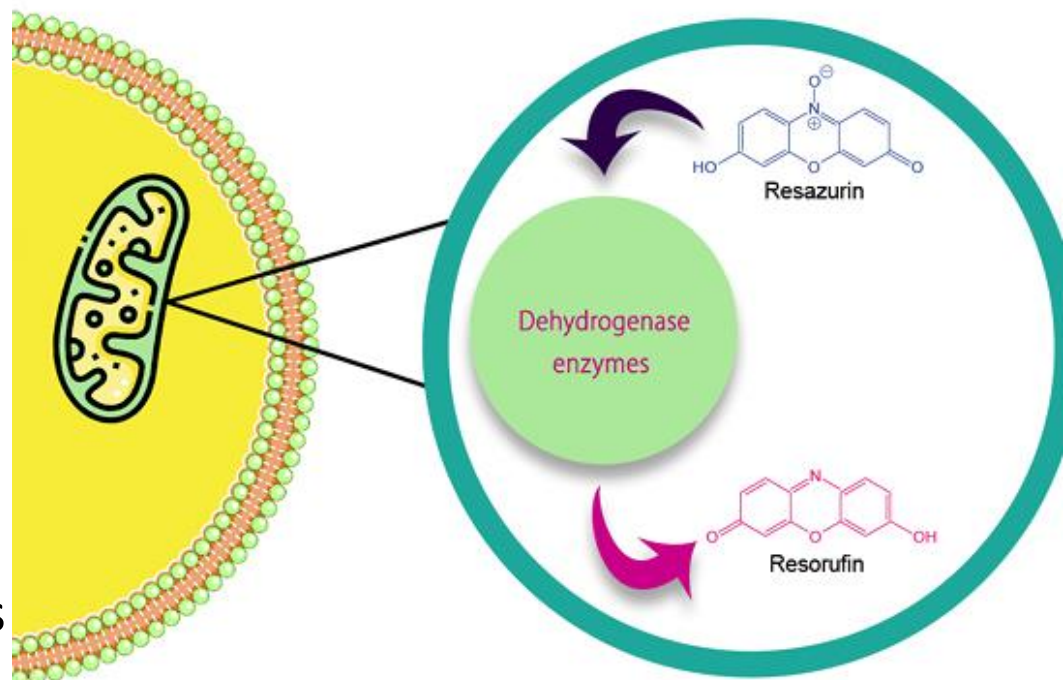
	Resazurina	Resorufina
Estado de oxidación	Oxidado	Reducido
Color	Azul	Rosa
Fluorescencia	Muy baja o nula	Alta
Longitud de onda medida	600 nm	570 nm
Estabilidad	Relativamente estable	Inestable a larga exposición de luz o calor

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 ✗

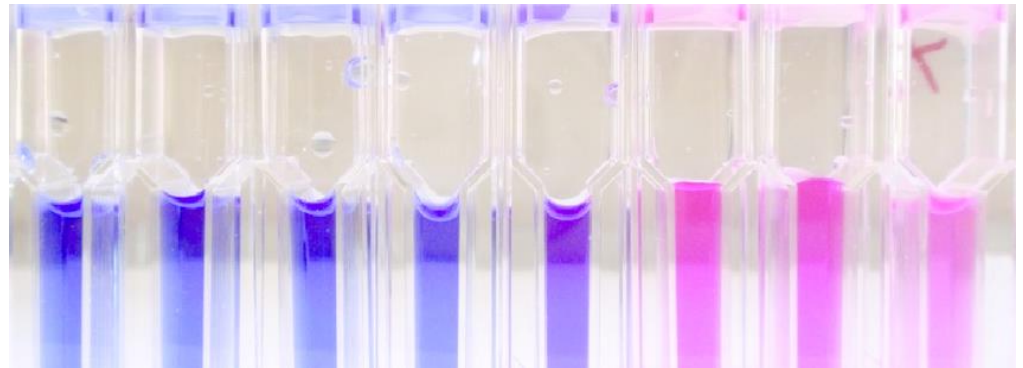


3. FUNDAMENTO TEÓRICO

REACTIVO ALAMAR *BLUE*™

MECANISMO

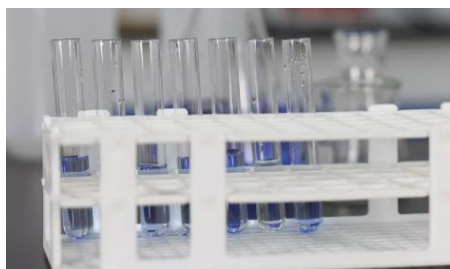
- ■ Fluorescencia ■ Cél. Viables



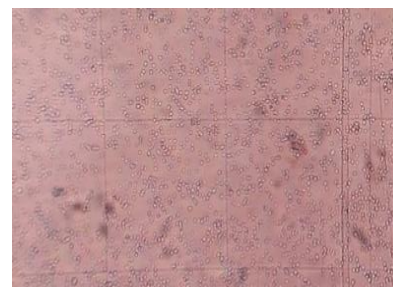
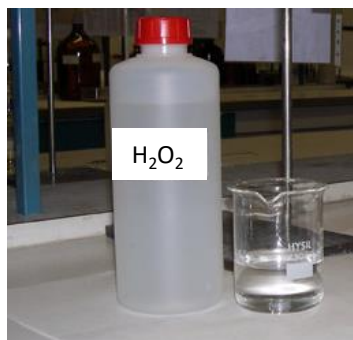
Espectrofotómetro (Absorbancia)

4. MATERIALES

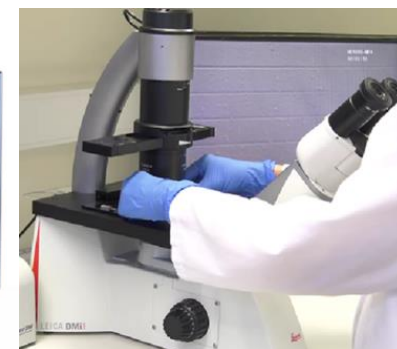
Materiales



Reactivos



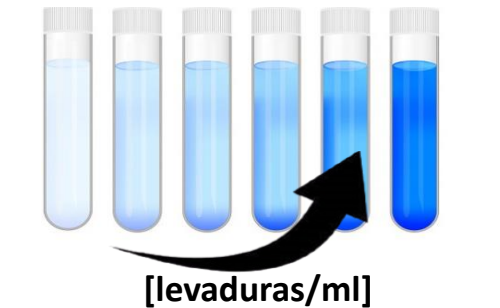
Equipos



5. METODOLOGÍA

VISTA GENERAL DE LOS MÉTODOS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS

1) ENSAYO DE VIABILIDAD



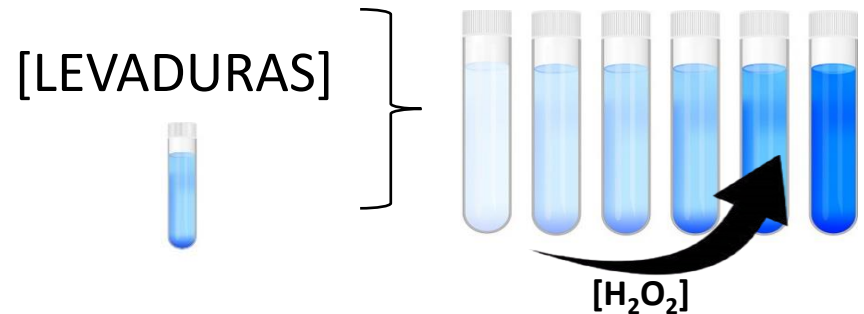
- [LEVADURAS]



- TIEMPO INCUBACIÓN



2) ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

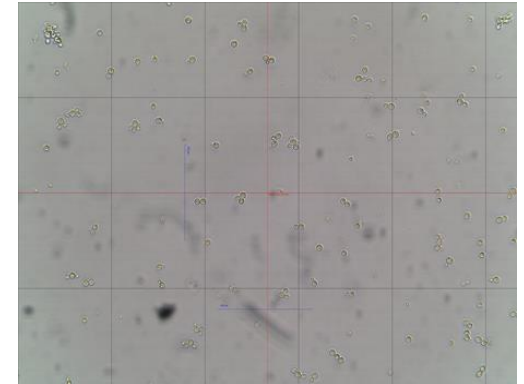


↑ CITOTOXICIDAD - ↓ VIABILIDAD

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

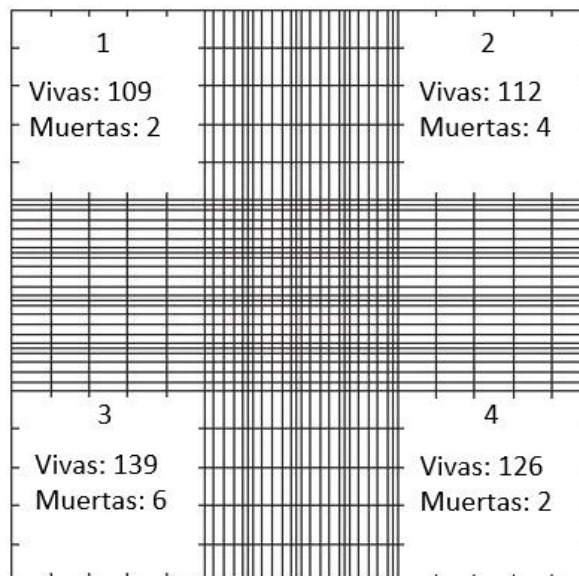


2) ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

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 (Resazurina)
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. 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

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

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

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

6. RESULTADOS

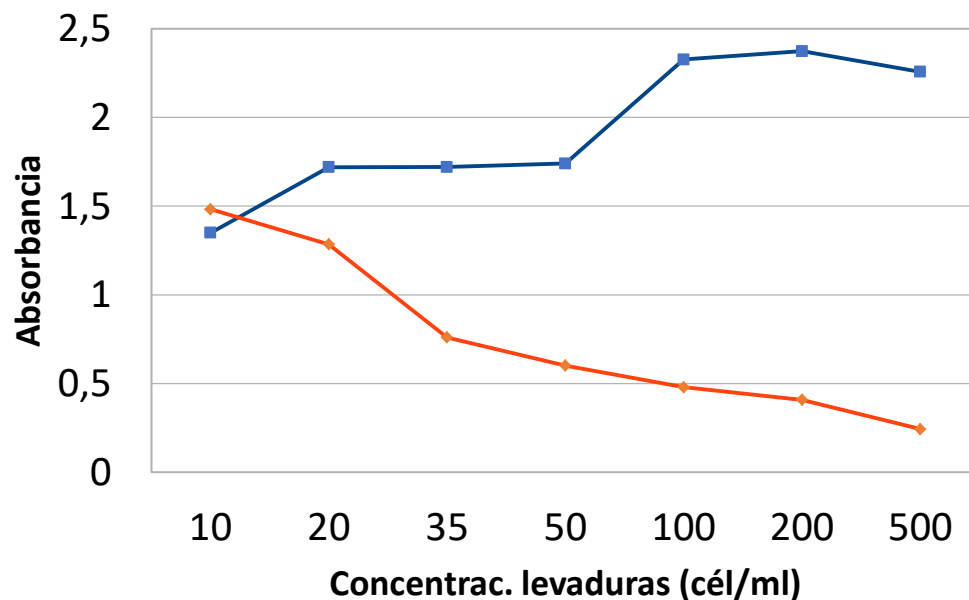
VIABILIDAD

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

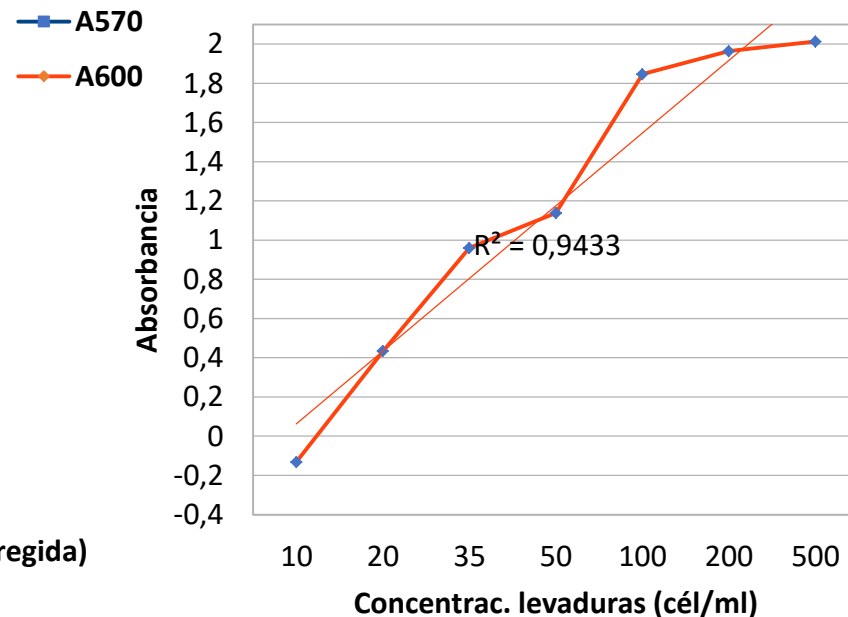


6. RESULTADOS

VIABILIDAD



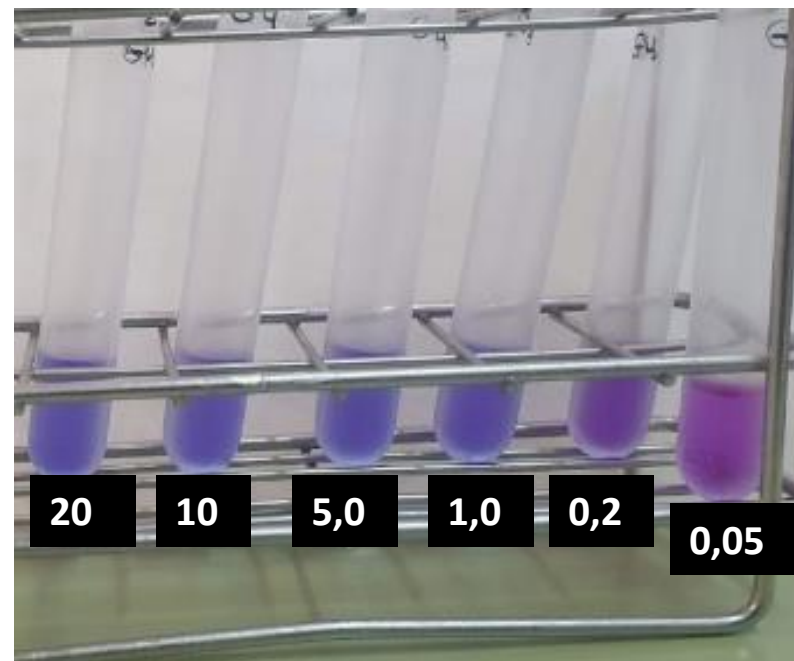
—♦— Acorregida
— Lineal (Acorregida)



6. RESULTADOS

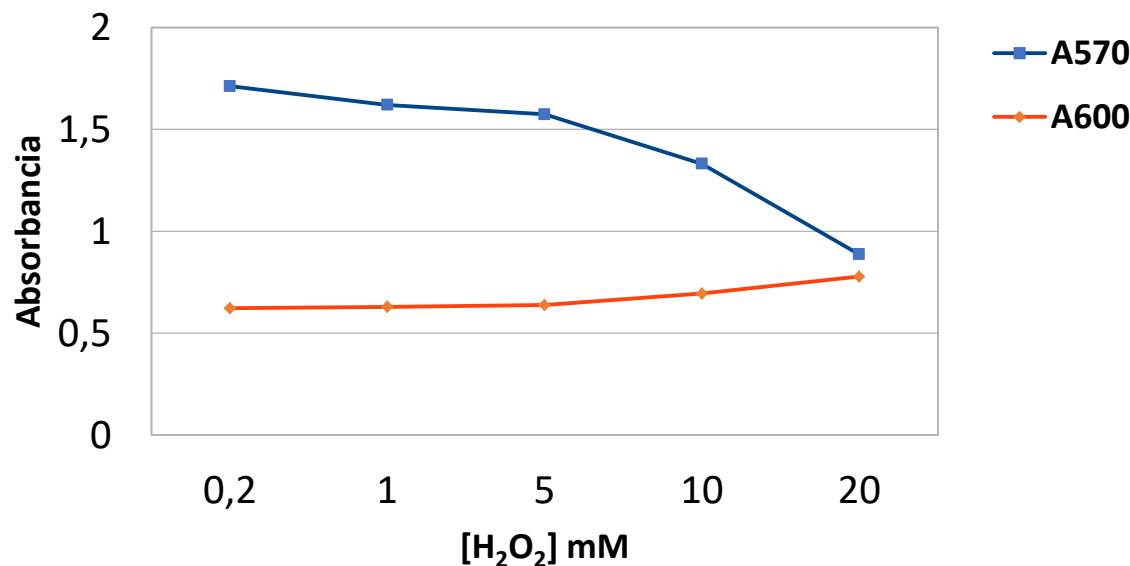
CITOTOXICIDAD

[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

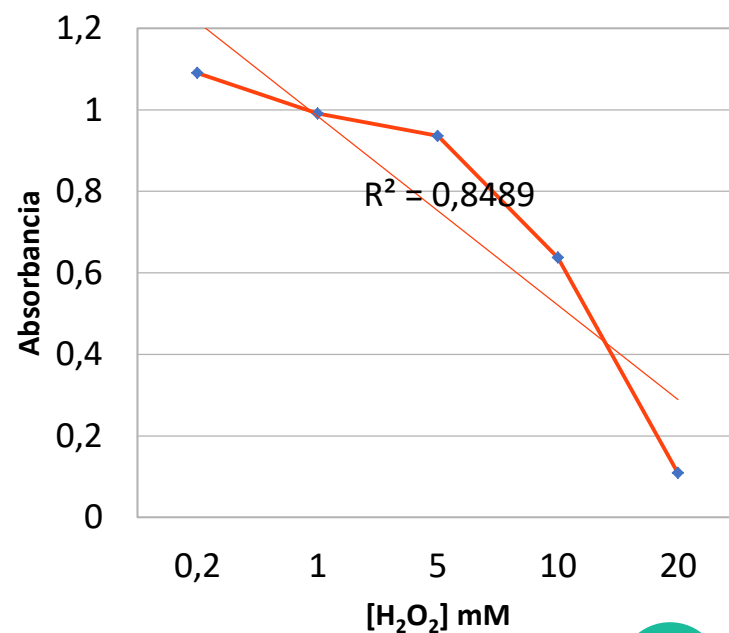


6. RESULTADOS

CITOTOXICIDAD



—◆— Acorregida
— Lineal (Acorregida)



6. CONCLUSIÓN

CANTIDAD DE CÉLULAS

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

TIEMPO DE INCUBACIÓN

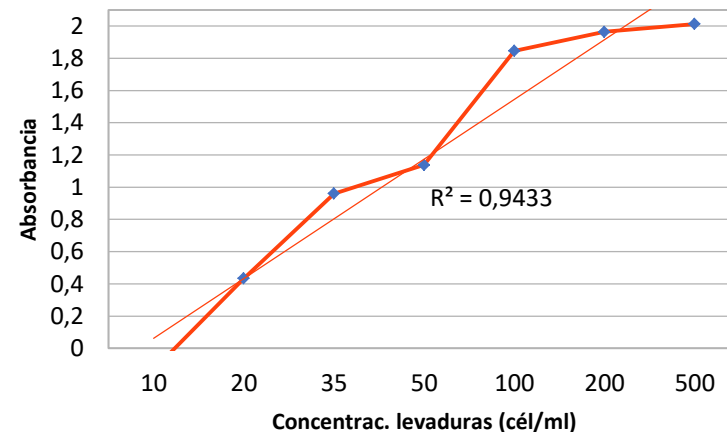
- Más de 24 horas
- A mayor tiempo, más sensibilidad
- Se vuelve incoloro

TEMPERATURA DE INCUBACIÓN

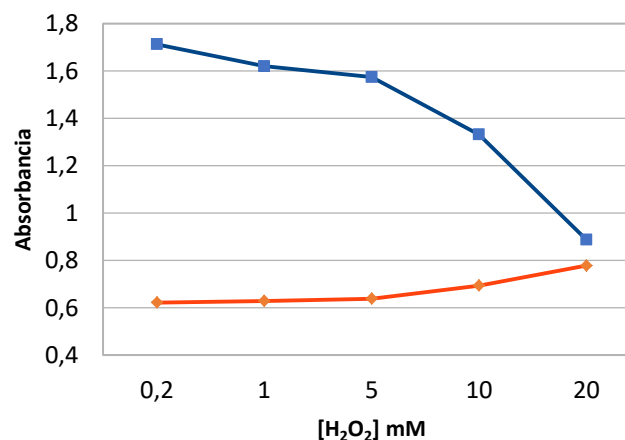
- 4°C parada

CITOTOXICIDAD

VIABILIDAD



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**

