

# ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN UN CULTIVO CELULAR

## CYTOTOXICITY ASSAY IN A CELL CULTURE



### INTRODUCCIÓN

La viabilidad y la toxicidad celular se pueden determinar en función de varios aspectos. La integridad de la membrana plasmática, la síntesis de ADN, el contenido de ADN, la actividad enzimática, la presencia de ATP y las condiciones de reducción celular son indicadores conocidos de la viabilidad celular y la muerte.

Las técnicas para cuantificar la viabilidad, la migración y la invasión celular presentan el inconveniente de que destruyen las células durante la prueba.

El colorante vital **Alamar Blue (AB)** se puede utilizar para diferentes tipos de células eucariotas sin dañarlas. El reactivo de viabilidad celular Alamar Blue (también conocido como **resazurina**) se utiliza en varias líneas celulares humanas, animales y vegetales, bacterias y hongos. Esta prueba puede aplicarse tanto a células adherentes como a células en suspensión, así como a co-cultivos y modelos 3D avanzados.

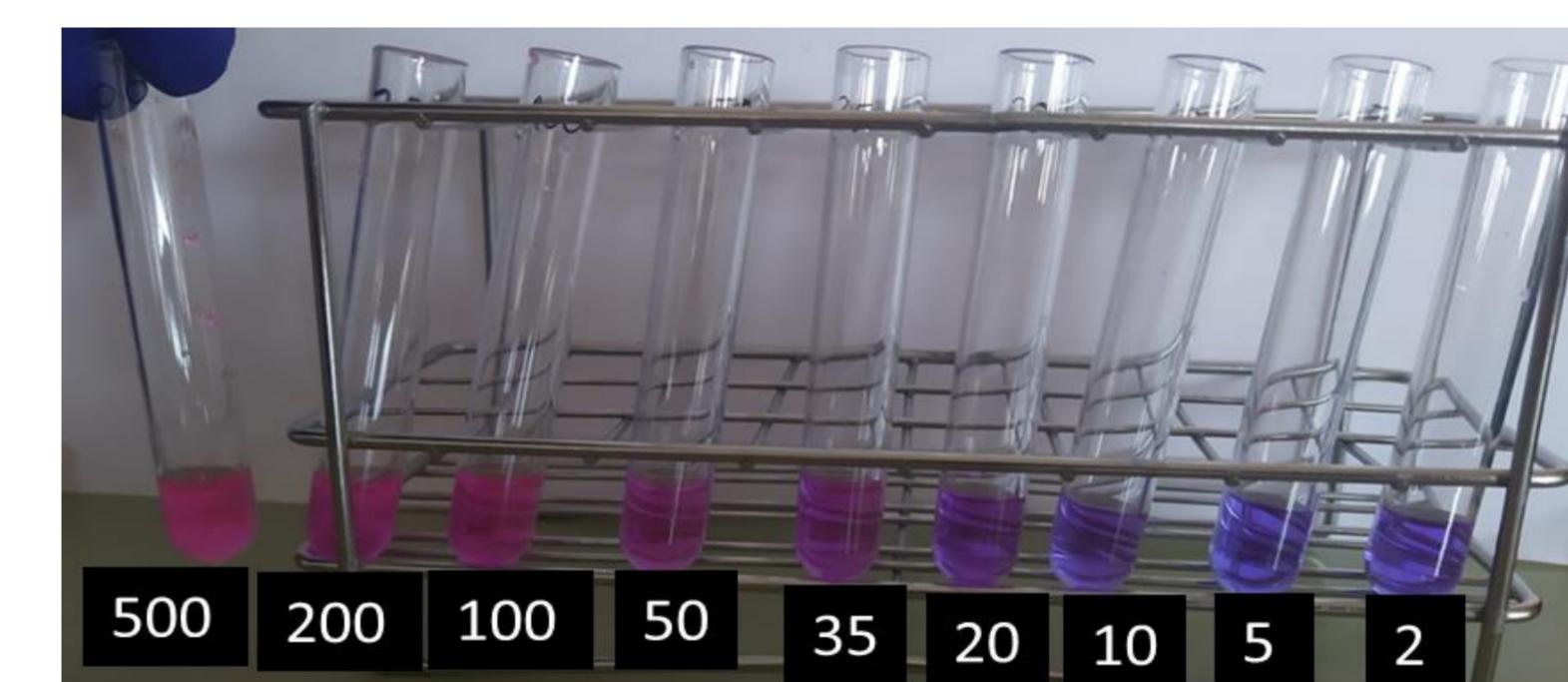
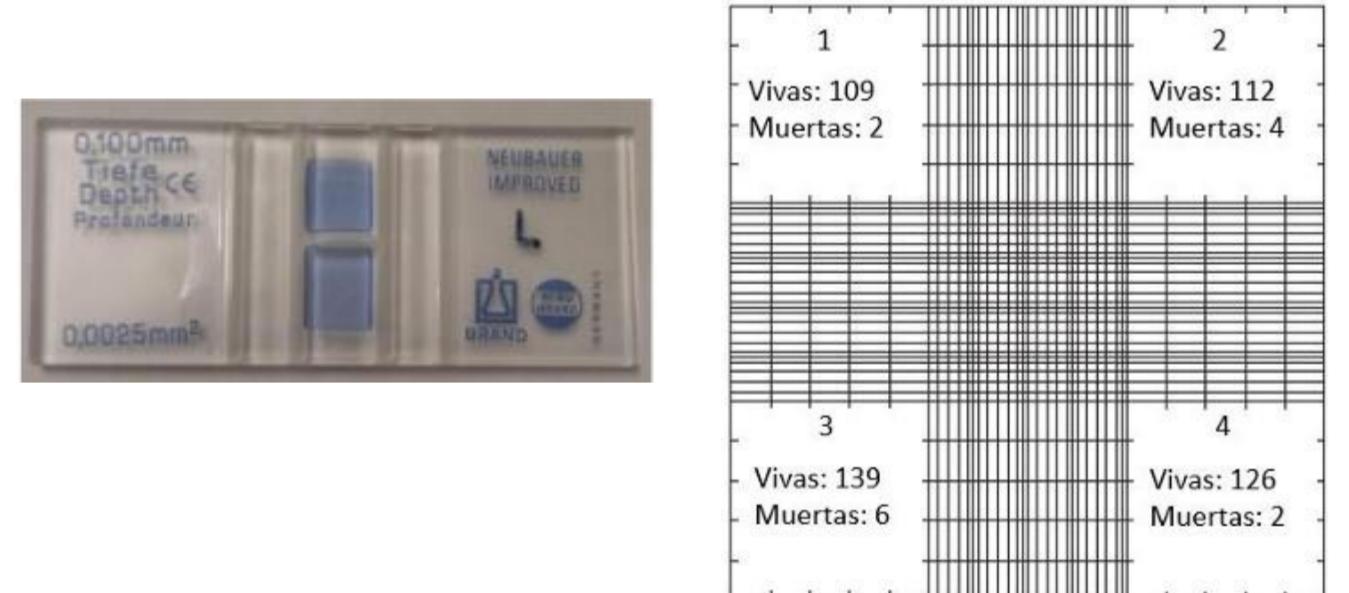
La resazurina es el reactivo básico del AB, que es un compuesto no tóxico y permeable a las células de color azul y prácticamente no fluorescente. El ensayo de viabilidad celular de resazurina es un ensayo fluorescente que detecta la **actividad metabólica mitocondrial de la célula** de modo que la célula viable puede reducir este compuesto.

La resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido) es un colorante azul no fluorescente hasta que se reduce irreversiblemente a **resorufina** fluorescente de color rosado-rojo y altamente fluorescente, por las enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas.

### MÉTODO

#### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE CÉLULAS - DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN ÓPTIMO CON RESAZURINA

1. **Preparación del inóculo:** Se prepara una suspensión de levaduras en medio de cultivo con un 2 % de glucosa.
2. **Incubación y recuento:** Tras 2 horas de incubación a 28°C se realiza un recuento y % de viabilidad celular con azul tripán en cámara de Neubauer.
3. **Concentración:** A partir de la suspensión celular se prepara una batería de tubos de ensayo con **concentraciones crecientes de levaduras en un rango de 2.000-500.000 células/ml en suspensión**.
4. A cada tubo se añade **10 % del reactivo Alamar Blue y se incuban 28°C** en estufa en ausencia de luz.
5. Se mide cada tubo a 570 nm y 600 nm. **Obtenemos A<sub>570</sub> - A<sub>600</sub> para cada muestra.** La absorbancia generada a partir del ensayo es proporcional al **número de células vivas en la muestra**.
6. **Tiempo:** Se mide a 570 nm y 600 nm a 1 hora, 4 horas, 24 horas, 48 horas.
7. El color es estable a 4°C en ausencia de luz. Se realizó otra medida a los 4 días.

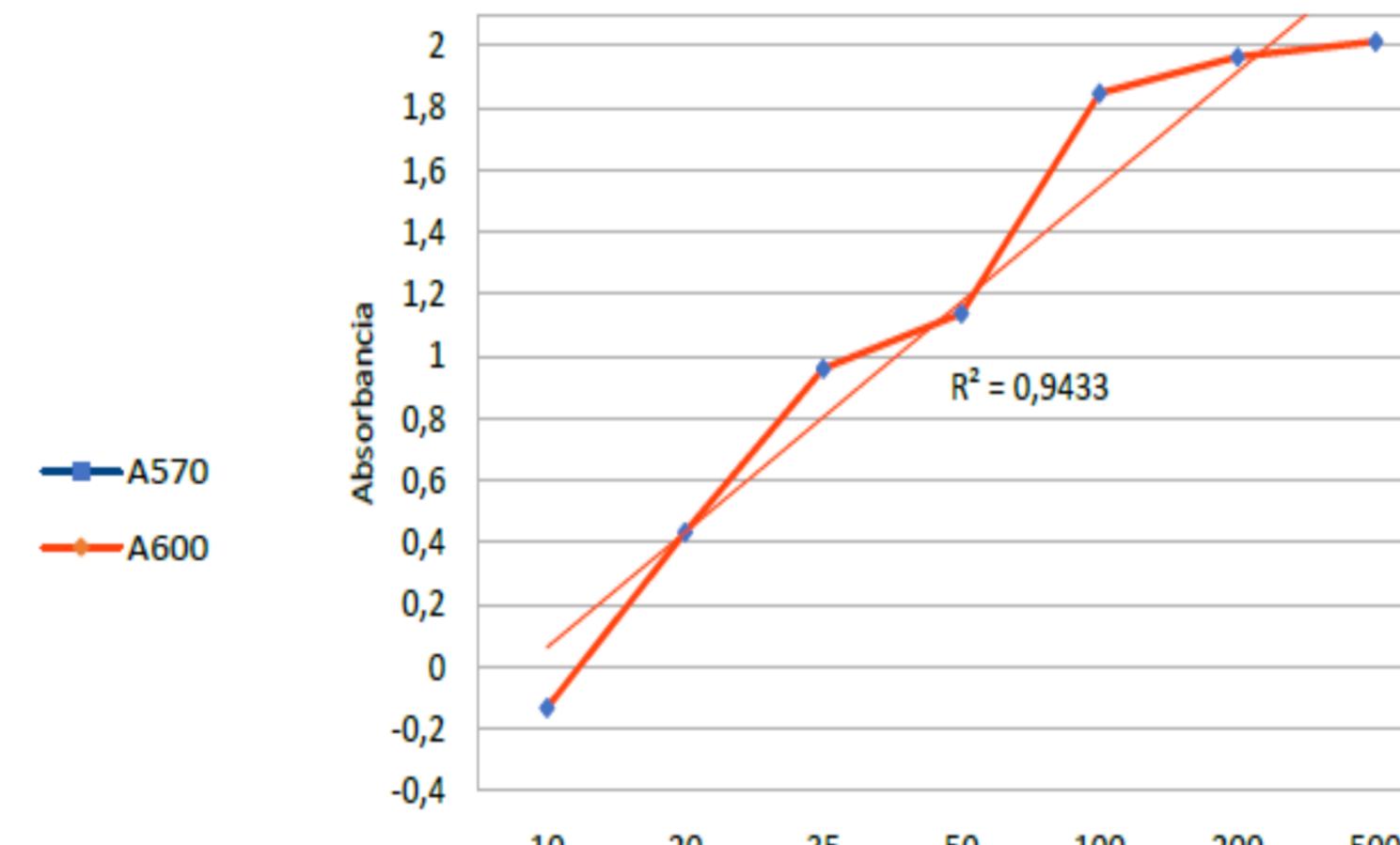
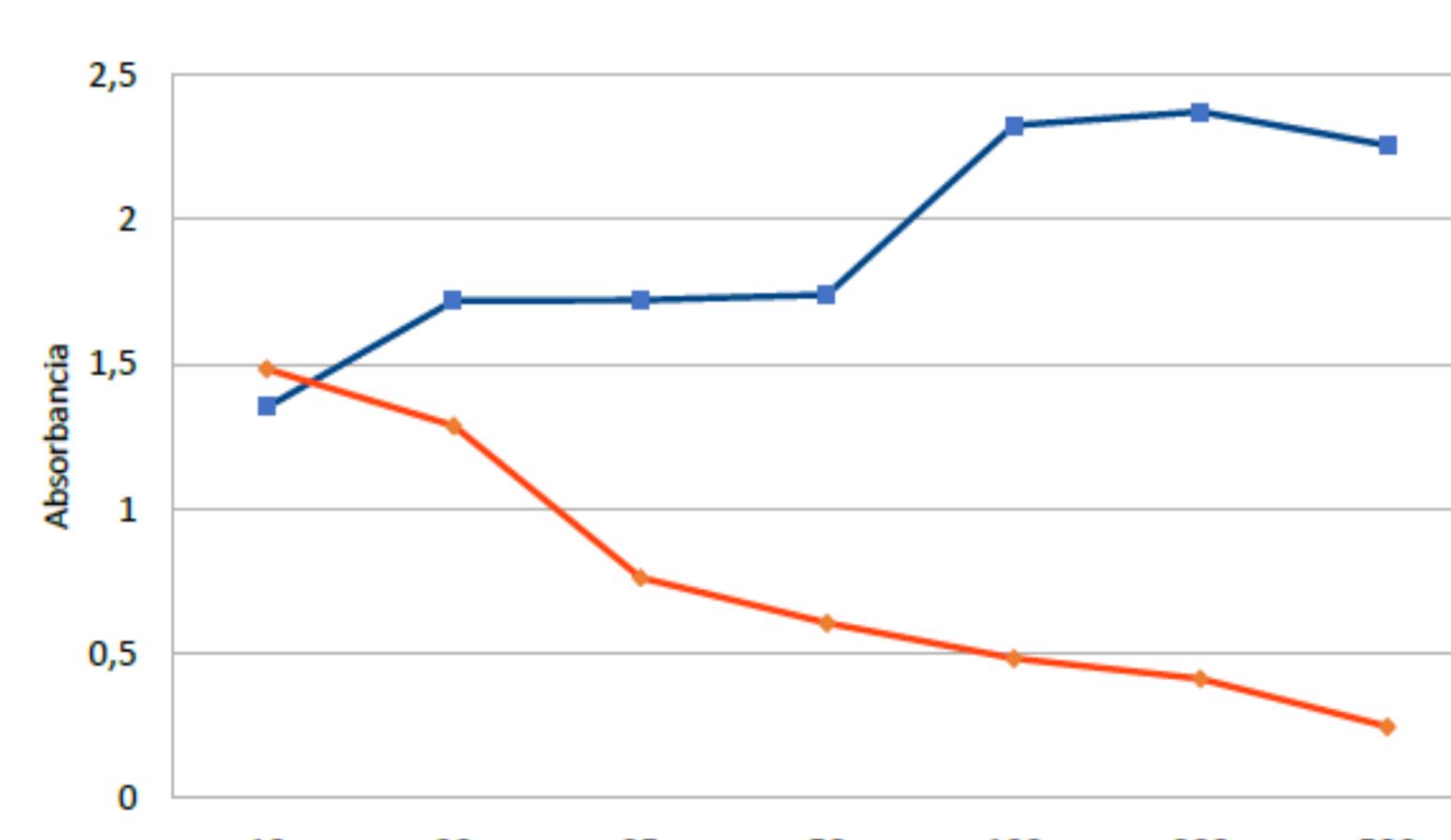


### RESULTADOS

- La **concentración adecuada para el ensayo de viabilidad** es la que se encuentre en una zona intermedia de la curva de calibración, calculamos que **entre 2,0 y 5,0 x 10<sup>4</sup> levaduras**.
- Los tiempos de incubación pueden variar según las tasas metabólicas de las líneas celulares, pero en cualquier caso la **sensibilidad de la detección aumenta con tiempos de incubación más largos**. Para muestras con menos células, se debe incubar más tiempo hasta 24 horas. En este ensayo el tiempo de incubación deseable es de 24 horas o más para el desarrollo del color.
- La forma oxidada (**resazurina de color azul**) tiene su máximo de absorbancia a **600 nm**. La forma reducida (**resorufina de color rosa-rojo**) tiene su máximo de absorbancia a **570 nm**.

### RESULTADOS: VIABILIDAD-CONCENTRACIÓN CELULAR-TIEMPO

Levaduras (cél/ml)	A570	A600	A570-A600 (A corregida)
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



Tras obtener los resultados, se realiza la curva de calibración que tiene 2 funciones:

- Extrapolar y calcular la concentración.
- Ver el rango de linealidad de la técnica (intervalo que sigue la proporción absorbancia-concentración).

La concentración adecuada para la ensayo de viabilidad es la que se encuentre en una zona intermedia de la curva de calibración.

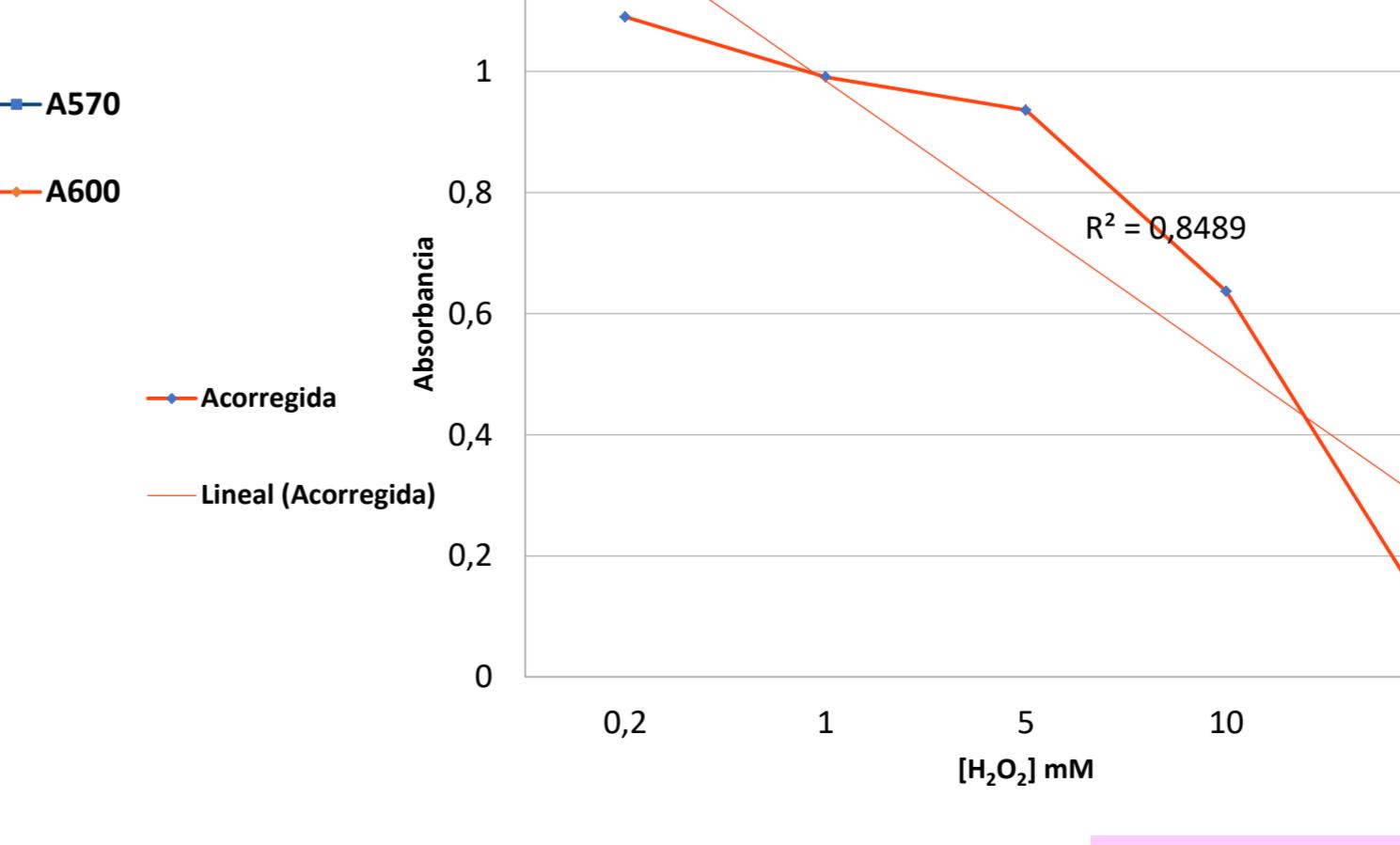
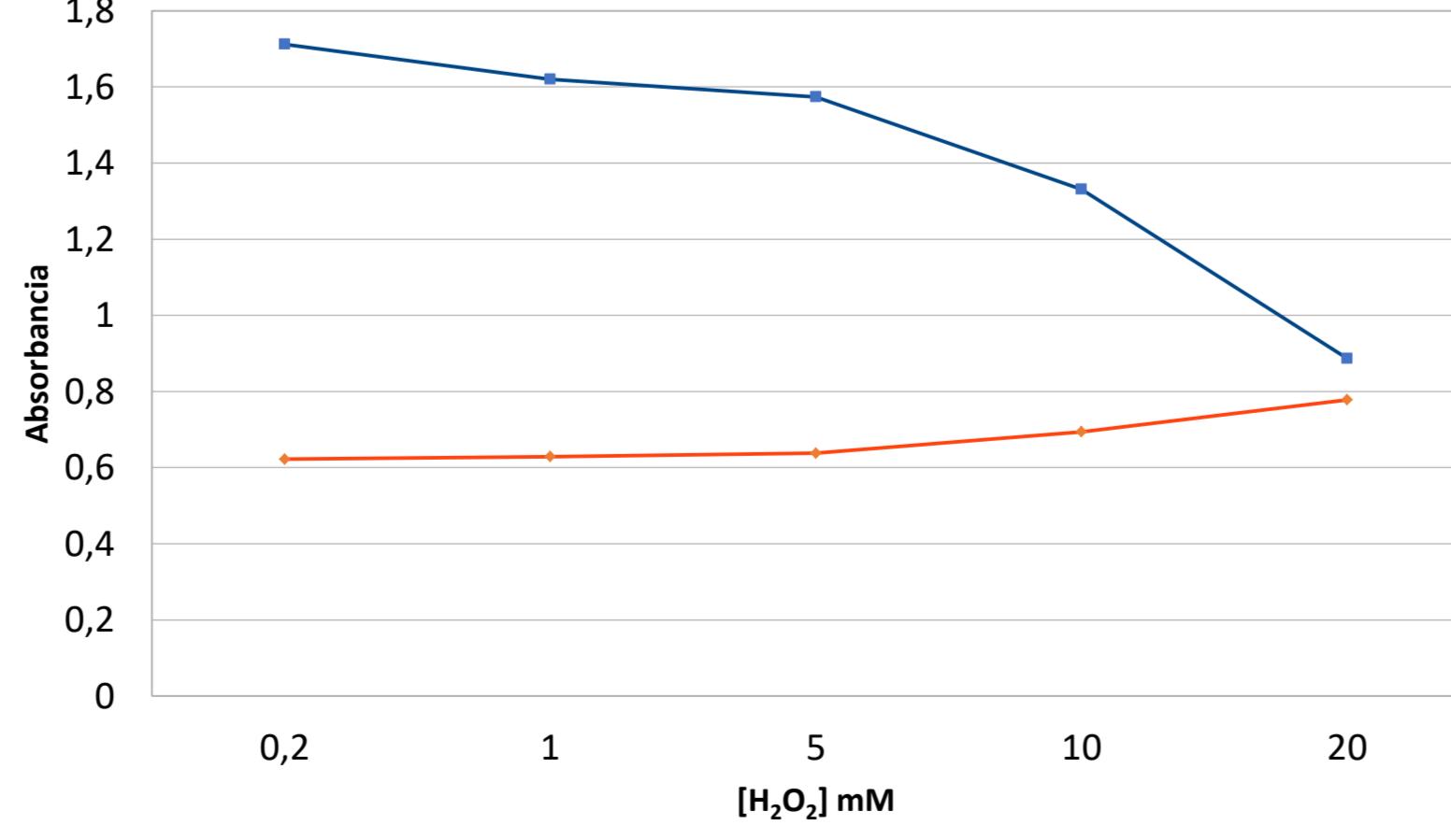
### RESULTADOS: CITOTOXICIDAD EN CULTIVO

#### CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS

- A mitad de la curva de calibración: 5 x 10<sup>4</sup> células

#### TIEMPO DE INCUBACIÓN

- Más de 24 horas
- A mayor tiempo, más sensibilidad
- Estabilidad a 4°C varios días en ausencia de luz.
- Se vuelve incoloro



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

### CONCLUSIONES

- ✓ **Cantidad de células:** es importante que la cantidad de células empleada en el ensayo sea la adecuada. Una concentración alta o baja puede causar interferencias y resultados erróneos.
- ✓ **Relación tiempo y sensibilidad:** a mayor tiempo de incubación mayor es la sensibilidad de la prueba.
- ✓ **Tipo celular:** para evaluar correctamente la citotoxicidad se debe tener en cuenta el tipo celular, el tipo de crecimiento (adherente o en suspensión), metabolismo, medio de cultivo, etc. En células en suspensión puede ser recomendable centrifugar antes de medir.
- ✓ **Estudio de citotoxicidad:** A partir de los datos obtenidos se realizó un ensayo de citotoxicidad con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a distintas concentraciones, distintos medios de cultivo y con y sin centrifugación antes de la medida espectrofotométrica.

### 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. Monitoring cell health with alamarBlue and PrestoBlue reagents using the Varioskan LUX Multimode Microplate Reader La prueba AB puede aplicarse tanto a células adherentes como a células en suspensión, así como a cocultivos y modelos 3D avanzados. © 2018 Thermo Fisher Scientific.
4. 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