

PRÁCTICA IV.2

PRUEBAS DE TAMIZAJE PARA DETERMINAR EFECTOS CITOTÓXICOS EN EXTRACTOS, FRACCIONES Ó SUSTANCIAS, UTILIZANDO LA PRUEBA DEL MTT

DETERMINATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF EXTRACTS, FRACTIONS, OR SUBSTANCES, BY MEANS OF THE MTT TEST

Clemencia de Castro de Pardo. *Directora Investigación Básica. Basic reserch director. Faculty of medicine. Facultad de Medicina. Fundación Universitaria San Martín. Bogotá, Colombia.*
cdepardo@sanmartin.edu.co

Propósito.

Utilizar el método del MTT para determinar el posible efecto citotóxico de un agente sobre líneas celulares tumorales ó cultivos primarios de células normales.

Ensayo del MTT.

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular.

La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Este método fue desarrollado por *Mosmann* en 1983 siendo modificado en 1986 por *Francois Denizot* y *Rita Lang*.

Materiales

- Material vivo

Líneas celulares tumorales
 Cultivos primarios de tejido sano.

- Extractos, sustancias ó moléculas a probar.
- Soluciones y reactivos.

Dimetil Sulfónico al 0.2 %
 Medio de cultivo
 Tripsina EDTA
 Suero fetal bovino

Penicilina-Streptomicina
 MTT
 Tampón fosfato libre de calcio y magnesio
 Isopropanol.

- Equipos.

Cabina de flujo laminar
 Incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂
 Centrífuga
 Micropipetas
 Lector de Elisa
 Microscopio invertido

- Otros

Cajas de cultivo de 96 pozos
 Pipetas de vidrio

Metodología.

- Utilizando tripsina EDTA disociar las células y resuspenderlas en medio de cultivo suplementado (10 % de Suero fetal bovino y antibiótico).
- Para determinar el número de células requeridas por pozo, es necesario realizar la técnica con células sin la sustancia a analizar y su Densidad óptica (DO) debe ser mayor ó igual a 1.
- Utilizando cajas de 96 pozos siembre células acorde al paso anterior por pozo. En la mayoría de las líneas celulares son 50.000 células.
- Se incuban a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia.
- Se prepara el extracto, fracción o sustancia en DMSO (0.2 %, concentración no tóxica). De tal manera que al añadir 20 µL al pozo tenga la concentración deseada.
- Se añade 20 µL de la sustancia problema por pozo.
- Se incuban a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir que la sustancia actúe en todas las células en caso de que su acción sea sobre una fase específica del ciclo.
- Se descarta el medio.
- Se coloca 100 µL de medio sin suero, ni rojo fenol por pozo.
- Se añade 50 µL de MTT (mg/ml) en solución tampón libre de calcio y magnesio.
- Se incuba por 4 horas a 37 °C para permitir la formación de cristales de formazán.
- Luego se elimina el sobrenadante.
- Se añade 100 µL de isopropanol.
- Se dejan los cultivos a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazan sean disueltos.

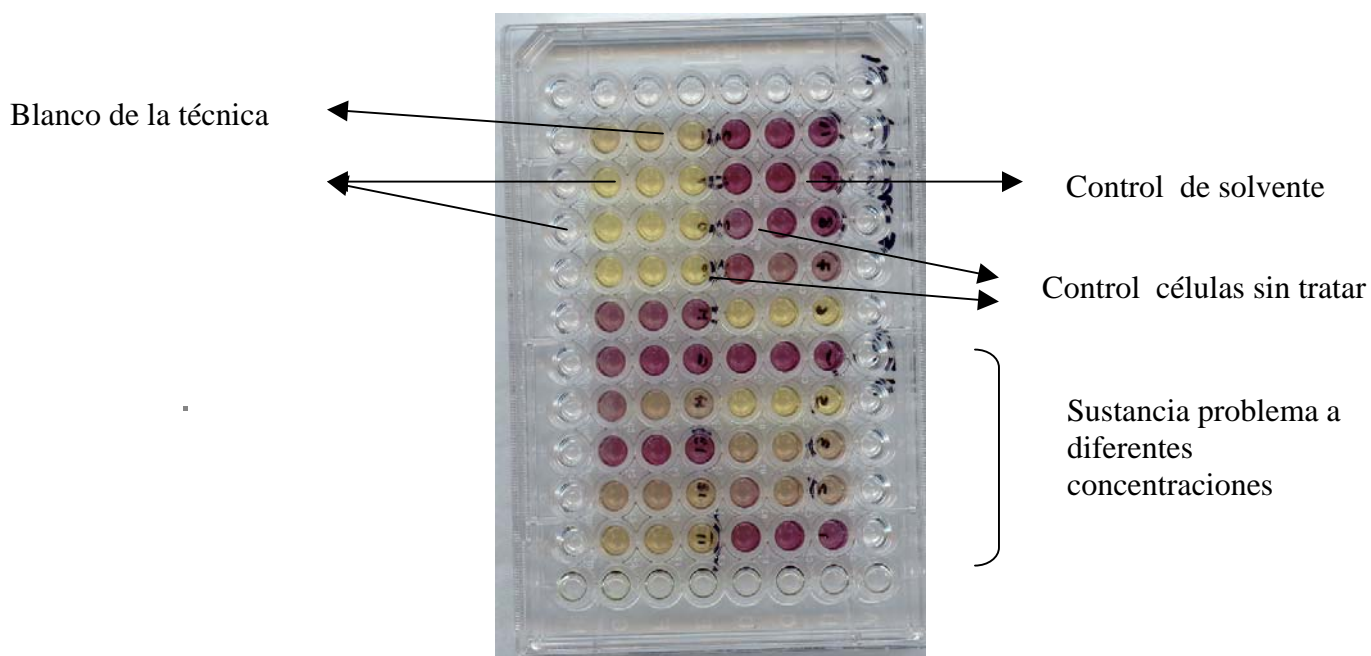
- La lectura de densidad óptica (DO) se realiza en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

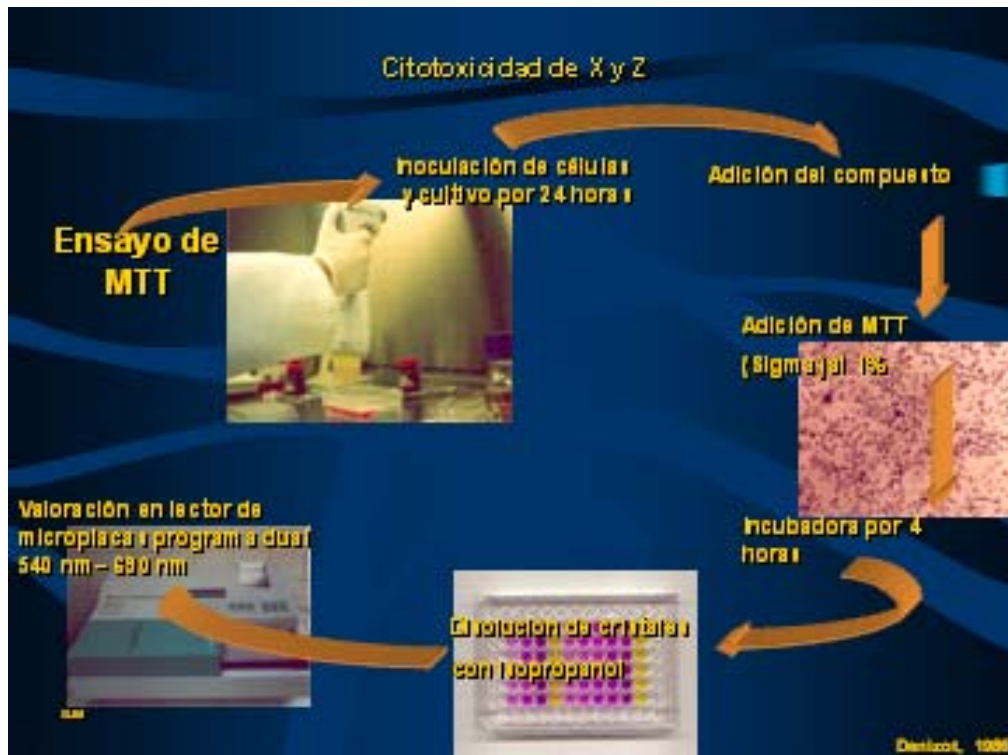
El porcentaje de Viabilidad se obtiene de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas}}{\text{DO células control}} \times 100$$

Para cada ensayo es indispensable realizarlo mínimo por triplicado, con controles negativos (solvente), controles positivos (sustancia que de antemano se conozca su poder citotóxico) y células no tratadas las cuales deben dar una lectura de DO mayor ó igual a 1.

Los valores de comparación se hacen sobre una base de 50 % de inhibición de crecimiento (IC_{50}) en las células tratadas con los agentes específicos.





Bibliografía.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 1983; 65: 55–63.

Denizot F., Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 1986; 89: 271–277.

Bonifaz L., Terrazas L., García F. Medida de la linfoproliferación *in vitro* por reducción de sales de tetrazolium. *Bioquímica* 1992; 17 (68): 31–38.

Cordero CP, Aristizábal FA. Evaluación preliminar *in vitro* de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2003; 4(1): 100-106.

Clemencia de Castro de Pardo

cdeparado@sanmartin.edu.co

El trabajo en los laboratorios de Medicinal Chemistry debe mantener altos estándares de precaución y buen uso.

El manejo de instrumental eléctrico, la utilización de calor, el material de cristal y los disolventes no presentan un especial problema, si se siguen las instrucciones del supervisor.

Este documento ha sido supervisado por la Prof. Clemencia de Castro de Pardo (*cdeparado@sanmartin.edu.co*) quien informa que no existen problemas específicos de seguridad en la realización de este ejercicio, incluyendo toxicidad, inflamabilidad y explosión, ni cualquier otro destacable, dentro de lo usual en un laboratorio de Medicinal Chemistry.

Las técnicas de formación de colonias no representan riesgo para el alumno. La técnica de MTT requiere el manejo de esta sustancia con guantes y dentro de una campana de extracción porque la sustancia es tóxica.

Se agradecerá comunicar al Editor cualquier posible incidencia.

EXERCISE IV.2

DETERMINATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF EXTRACTS, FRACTIONS, OR SUBSTANCES, BY MEANS OF THE MTT TEST

Clemencia de Castro de Pardo

Faculty of Medicine, Fundación Universitaria San Martín, Bogotá, Colombia

E-mail: cdepardo@sanmartin.edu.co

Purpose of the assay

To use the MTT redox assay in order to determine the potential cytotoxic effect of a given agent on cell lines tumor or primary cultures from the normal cells.

MTT redox assay

The assay is based on the metabolic bromide reduction from 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazole (MTT), that is produced by the mitochondrial enzyme succinate-dehydrogenase, turned to a blue-colored compound named formazan. The mitochondrial functionality of the treated cells is then determined. This method has been extensively used to measure cell proliferation and survival capacities.

The remaining living cells are proportional to the amount of formazan produced.

The method was first developed by Mosmann in 1983, and later modified by Francois Denizot and Rita Lang in 1986.

Materials

- Living materials
 - Tumor cell line cultures
 - Primary normal cell culture
- Extracts, compounds, or substances to be tested
- Reagents and solutions
 - 0.2 % Dimethyl sulfoxide (DMSO)
 - Trypsin/EDTA
 - Fetal calf serum
 - Penicillin-streptomycin
 - MTT
 - Buffer phosphate (both Ca and Mg free)
 - Isopropanol
- Equipment
 - Laminar flow cabinet

Cell incubator (37 °C, 5 % CO₂)
 Centrifuge
 Micropipettes
 ELISA reader
 Inverted microscope

- Others

96-well microtitre plates
 Glass pipettes

Methodology

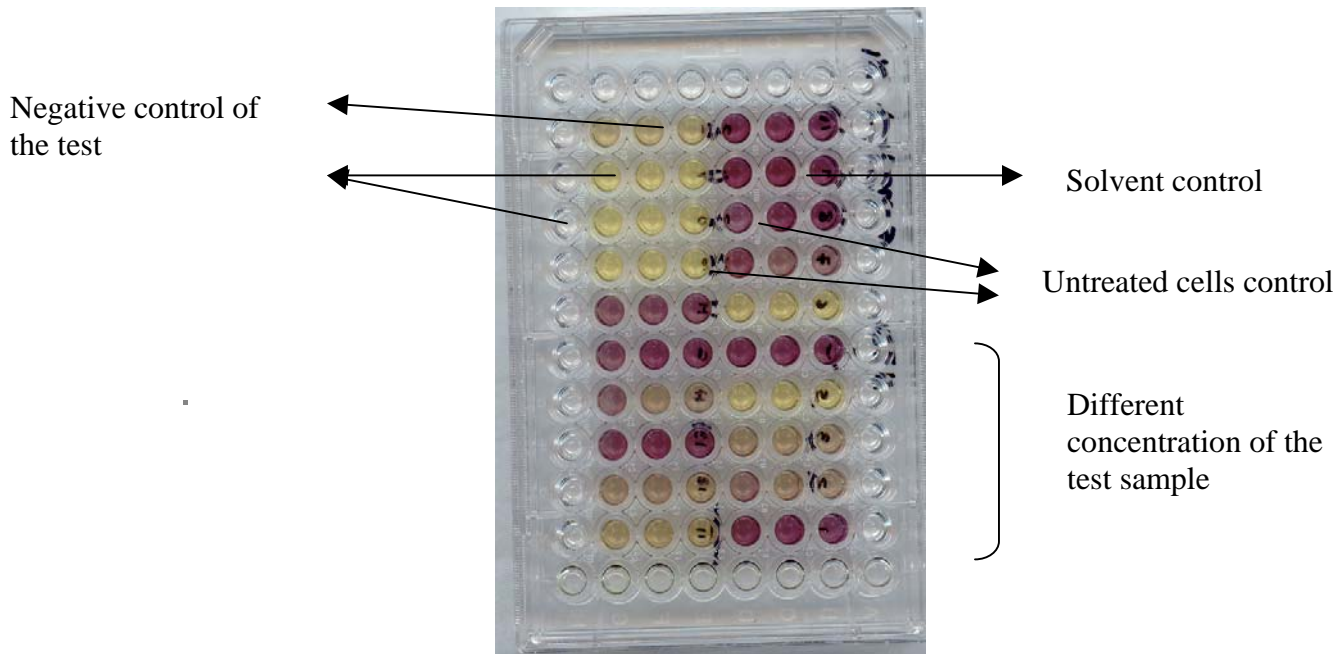
- Dissociate the cells using Trypsin/EDTA, resuspend them in supplemented culture media (antibiotics plus fetal calf serum).
- To be able to determine the required number of cells per well, it is necessary to perform the assay without the substance to be analyzed. The optical density (OD) must be 1 or more than 1.
- Considering the last fact, plant the cells into the 96-well microtitre plate; in most of the cell lines, 50.000 cells are used per well.
- The cells are incubated for 24 h at 37 °C, 5 % CO₂ to allow the attachment to the surface of the well.
- The sample (substance or extract to be analyzed) is prepared in DMSO 0.2 % (nontoxic concentration), in a way that the desired final concentration is reached adding 20 µL to the well.
- Add 20 µL of the sample solution to every well.
- Incubate 24 h at 37 °C, 5 % CO₂ to allow the substance to act on all the cells, including the case where it acts only in a specific phase of the cell cycle
- Discard the supernatant.
- Add to each well 100 µL of serum and phenol red free media.
- Add to each well 50 µL of MTT in a free Ca-Mg buffer.
- Incubate 4 h to allow formazan crystal formation.
- Discard the supernatant.
- Add 100 µL of isopropanol.
- Keep at room temperature until formazan crystals are dissolved.
- Read 450 nm OD.

Cell viability percentage is obtained as follows:

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{OD treated cells}}{\text{OD control cells}} \times 100$$

Each assay must be performed three times. Negative controls (solvent alone), positive controls (known cytotoxic substance), and untreated cells (OD 1 or more than 1) must be included.

Comparative values are calculated on a 50 % growth inhibition basis (GI₅₀), on the specific inhibitor agent treated cells.



Bibliography

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 1983; 65: 55–63.

Denizot F., Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 1986; 89: 271–277.

Bonifaz L, Terrazas L, García F. Medida de la linfoproliferación *in vitro* por reducción de sales de tetrazolium. *Bioquímica* 1992; 17 (68): 31–38.

Cordero CP, Aristizábal FA. Evaluación preliminar *in vitro* de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2003; 4(1): 100–106.

Clemencia de Castro de Pardo

cdeparado@sanmartin.edu.co

High standards in safety measures should be maintained in all work carried out in Medicinal Chemistry Laboratories.

The handling of electrical instruments, heating elements, glass materials, dissolvents and other inflammable materials does not present a problem if the supervisor's instructions are carefully followed.

This document has been supervised by Prof. Clemencia de Castro de Pardo (*cdeparado@sanmartin.edu.co*) who has informed that no special risk (regarding toxicity, inflammability, explosions), outside of the standard risks pertaining to a Medicinal Chemistry laboratory exist when performing this exercise.

The Colony formation techniques represent no risk for the students. The MTT technique requires the handling of this substance with gloves and within an extraction chamber because the substance is toxic.

If your exercise involves any "special" risks, please inform the editor.