

GUIA DE LABORATORIO

ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO*

Autora: Martha Lucia Ruiz Benitez

Programa académico: Química y Farmacia

Agosto 2020

Universidad Simón Bolívar



1. INTRODUCCIÓN

En el área de la ciencia, los estudios para la determinación biológica de compuestos, sustancias o extractos son de gran importancia debido a que inicialmente éstos deben ser probados en células (fuera del organismo) para determinar su potencial terapéutico respectivo. Estos estudios son llamados estudios *in vitro* en donde hace referencia a ensayos realizado ya sea en tubos de ensayo, placas de Petri, etc, que cumplen con ciertas características como la similitud de condiciones como temperatura, nutrientes, o el ambiente más propicio y próximo a las condiciones brindadas en el cuerpo humano.

Actualmente los estudios *in vitro* son los mayormente empleados de forma inicial para probar la eficacia y toxicidad de los compuestos que si éstos son eficaces en su fase inicial, éstos compuestos pasarán para la próxima etapa que son los estudios *in vivo* (pre-clínicos), en donde estos estudios *in vivo* consisten en probar el “fármaco” o molécula de interés en modelos animales para comprobar su eficacia, ruta de metabolización del “fármaco”, comparando siempre los animales simulando una enfermedad versus animales sanos para determinar y comparar su eficacia, en donde finalmente acabada esta fase con éxito seguirán con estudios clínicos donde será aplicado el “fármaco” a la población.

2. OBJETIVOS

- ❖ Determinar la finalidad de los estudios de actividad biológica *in vitro* mediante la implementación de los cultivos celulares en líneas tumorales.
- ❖ Conocer la metodología de evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de extractos vegetales sobre líneas celulares mediante el ensayo colorimétrico de reducción de MTT.
- ❖ Conocer el fundamento y evaluación de la apoptosis presente en líneas celulares a través de la citometría de flujo.

3. MATERIALES Y EQUIPOS

- ❖ Placa de 96 pozos
- ❖ Placa de 12 pozos
- ❖ Pipetas
- ❖ Frascos de cultivo
- ❖ Medios de cultivo
- ❖ SFB
- ❖ Antibióticos
- ❖ MTT

- ❖ DMSO
- ❖ Kit de apoptosis
- ❖ Incubadora
- ❖ Microscopio
- ❖ Citómetro de flujo

4. PROCEDIMIENTO

Los estudios biológicos son muy importantes ya que en estos estudios se determina el mecanismo de acción de un principio activo (fitoquímico) o fármaco sobre las células de interés (Figura 1). Inicialmente para verificar si un extracto de interés presenta un potencial terapéutico, ya sea con actividad antimicrobiana, antifúngica, antiviral y anticancerígena, es esencial iniciar con estudios *in vitro*, en donde se emplean células que se encuentran en crecimiento fuera del cuerpo que posteriormente a éste, debe continuarse con los estudios *in vivo* que aquí es donde se emplean modelos animales como en el caso del uso de ratones, ratas, conejos, chimpancés y finalmente, y de acuerdo a la eficacia y éxito de las pruebas anteriormente probadas en los anteriores modelos, ya que pasan a la realización de estudios en humanos.

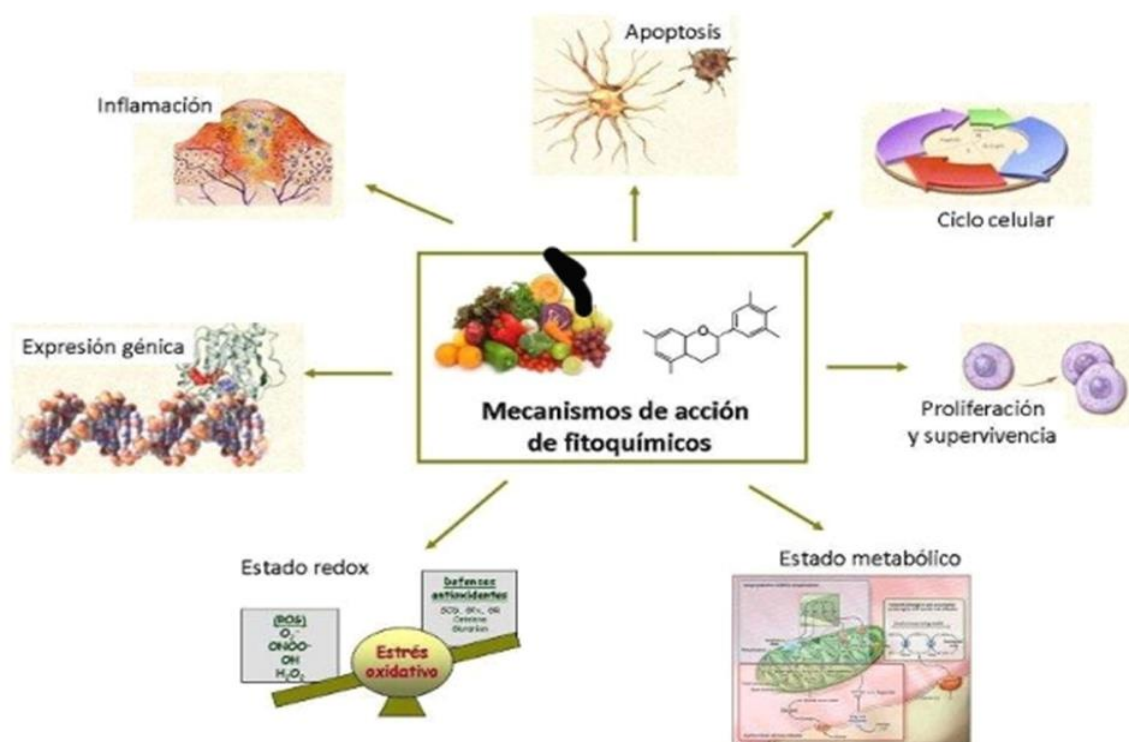


Figura 1. Actividad biológica *in vitro* de fitoquímicos

Fuente de imagen: <https://www.ictan.csic.es/investigacion/grupos-de-investigacion/metabolismo-y-bioactividad-de-fitoquimicos-biocell/>



ESTUDIOS *IN VITRO*

-Cultivo celular de líneas tumorales

Las diferentes líneas cancerígenas generalmente son obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection) y estas células son crecidas en frascos de cultivo con diferentes medios de cultivo como RPMI, DMEM, entre otros, junto con suero fetal bovino (SFB) y antibióticos, y serán mantenidas en una atmosfera controlada, a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂ en incubadora.

-Determinación de citotoxicidad (MTT)

Para la evaluación de citotoxicidad celular y viabilidad celular es realizado el test colorimétrico de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) donde inicialmente las células son plaqueadas en una placa de 96 pozos a una densidad de 1×10^5 (100µL/pozo) por 24 horas. Seguidamente a ese tiempo, se colocan los extractos a testar a diferentes concentraciones, ejemplo: 1 µM, 5 µM, 15 µM, 25 µM, 50 µM e 100 µM en diferentes pozos por 24 y 48 horas (se hace por triplicado). Posteriormente, las muestras son tratadas con el reactivo MTT (1mg/mL) durante 3 horas a 37°C y serán adicionados 100 µl de DMSO en cada pozo por 15 minutos a 150 rpm en el shaker para observar el cambio de color de amarillo a púrpura producto del metabolismo de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales de las células viables (Figura 2). Finalmente, las absorbancias son leídas en un lector de microplacas (492 nm) y el IC₅₀ (concentración µg/mL, que inhibe 50% del crecimiento celular) será determinada con la siguiente fórmula: crecimiento inhibitorio: $(1 - \text{Abs}_{492} \text{ células tratadas} / \text{Abs}_{492} \text{ células control}) \times 100\%$.

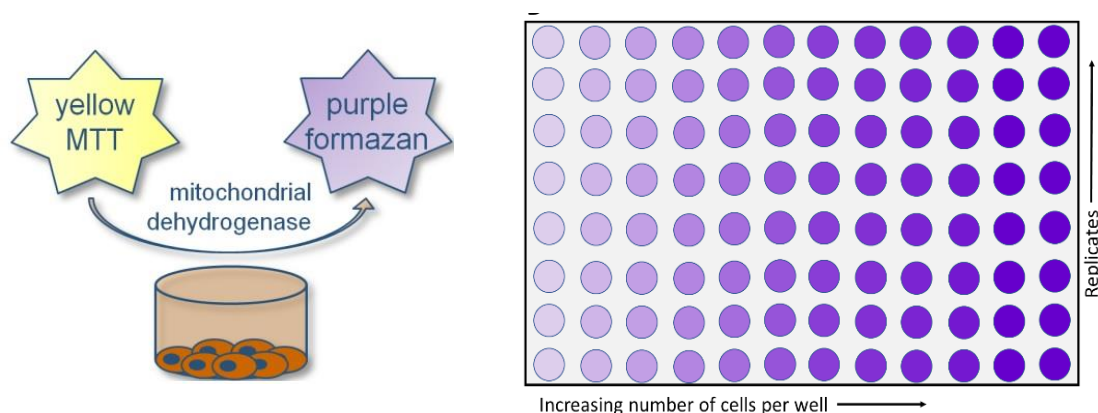


Figura 2. Fundamento de estudios de viabilidad celular (prueba de MTT)

Fuente de imagen: <https://www.eurofins.de/medizinprodukte-pruefungen/validierte-methoden/mtt-test/> y <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>



-Ensayo de apoptosis por citometría de flujo

Las líneas tumorales se plaquearán a una densidad de 10^5 células/pozo en placas de 12 pozos y serán incubadas con las concentraciones que alcanzaron el IC_{50} en el ensayo de MTT. Para el estudio de apoptosis será usado el kit de Guava Nexin (Guava Technologies), donde las células se incubarán con 100 μ l del reactivo Guava Nexin a oscuro y a temperatura ambiente por 20 minutos y posteriormente las muestras serán leídas en el citómetro de flujo (Muse™ Cell Analyzer, Merck Millipore Corporation). La interpretación del ensayo de apoptosis se lleva a cabo de la siguiente manera: Las células anexin V-negativas y 7-AAD-positivas indicarán la presencia de detritos nucleares; anexin V-positivas y 7-AAD-positivas indicarán presencia de células en apoptosis tardía; anexin V-negativas y 7-AAD-negativas indicarán células saludables, y anexin V-positivas y 7-AAD-negativas indicarán células en apoptosis inicial.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Cordero-Herrera I, Martín MA, Goya L, Ramos S. Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 hepatic cells. *Food Chem Toxicol* 64, 10-19 (2014). DOI: 10.1016/j.fct.2013.11.014.
- Goya L, Martín MA, Ramos S, Mateos R, Bravo L. A cell culture model for the assessment of the chemopreventive potential of antioxidant compounds. *Current Nutr Food Sci* 5, 56-64 (2009).
- Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Time course of quercetin-induced apoptosis in human hepatoma cells involves the differential regulation of cell survival/proliferation pathways. *Mol Nutr Food Res* 52, 457-464 (2008)
- <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>
- <https://www.eurofins.de/medizinprodukte-pruefungen/validierte-methoden/mtt-test/>
- <https://www.ictan.csic.es/investigacion/grupos-de-investigacion/metabolismo-y-bioactividad-de-fitoquimicos-biocell/>



- Martín MA, Ramos S, Mateos R, Marais J, Bravo-Clemente L, Khoo K, Goya L. Chemical characterization and chemo-protective activity of cranberry phenolic powders in a model cell culture. Response of the antioxidant defences and regulation of signaling pathways. *Food Res Int* 71, 68-82 (2015). DOI: 10.1016/j.foodres.2015.02.022.

PREGUNTAS

1. Investiga qué estudios son realizados para determinar la actividad antibacteriana de extractos o de un principio activo.
2. Cómo se evalúa (*in vitro* o *in vivo*) la actividad antiviral de un compuesto obtenido de fuentes vegetales.
3. Explique con sus palabras las diferencias entre estudios *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* e *in silico*.
4. Explique qué etapas deben ser seguidas para que un fármaco finalmente sea comercializado y suministrado en pacientes.