

PC_08 EVALUACIÓN METABÓLICA DE ACTIVIDAD CELULAR Y ESTUDIOS DOSIS- RESPUESTA MEDIANTE ENSAYOS CON ALAMARBLUE

Plataformas Científico-Tecnológicas: Laboratorios de
Investigación

Plataforma de Proteómica

Técnico Especialista Responsable: Dra. Sonia Morales Santana

www.ibsgranada.es



ibs.GRANADA
INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN
BIOSANITARIA

PC_08 Evaluación metabólica de actividad celular y estudios Dosis-Respuesta mediante ensayos con AlamarBlue

1. Antecedentes

La evaluación de la actividad metabólica celular es esencial en disciplinas como biología celular, farmacología y toxicología, especialmente en estudios de viabilidad celular y descubrimiento de fármacos. Los ensayos basados en resazurina permiten medir de forma fiable la viabilidad celular mediante la cuantificación de la capacidad reductora de células metabólicamente activas, que convierten la resazurina no fluorescente en resorufina altamente fluorescente.

Estos ensayos se caracterizan por ser homogéneos, no invasivos y de fácil ejecución, ya que requieren una única adición de reactivo sin pasos de lisis ni lavado, permitiendo además el uso posterior de las células en ensayos multiplexados. Presentan alta sensibilidad, amplios rangos de linealidad y un elevado rango dinámico, lo que posibilita la **determinación de porcentajes de viabilidad celular, curvas dosis-respuesta y valores EC₅₀/IC₅₀.**

Entre ellos, el ensayo alamarBlue, basado en resazurina, es uno de los métodos de referencia por su robustez y versatilidad. La combinación del reactivo alamarBlue con el lector multimodo Varioskan LUX y el software SkanIt permite realizar estas determinaciones de manera rápida, sensible y con un procesamiento avanzado de datos, optimizando significativamente los flujos de trabajo experimentales.

2. Servicio Ofertado

- a) **Realización de ensayos de viabilidad celular, dosis respuesta de tratamientos y EC₅₀/IC₅₀.**

b) **Análisis de resultados**

3. Equipos de análisis y muestras a analizar

- Lector de placas Varioskan, modelo Modular Multimode Microplate Reader Varioskan LUX, con software SkanIt incluido.
- Cabina de bioseguridad clase II
- Incubador celular (37 °C, 5 % CO₂)
- Tipo de Muestra: Líneas celulares adherentes o en suspensión en fase exponencial en placas de 96 pocillos con réplicas técnicas. Consultar con la técnica para el diseño de placa e inclusión de controles y blancos.
- Volumen requerido: 100 µl células en fase exponencial por pocillo.

4. Reactivos

Kit comercial (dependiendo de preferencias de cliente).

- Parada de la reacción opcional: 3% SDS in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4.

5. ENSAYO AlamarBlue:

Las células deben sembrarse previamente en microplacas negras de 96 pocillos con fondo transparente, ajustando la densidad celular y empleando al menos triplicados técnicos por condición. Para estudios de dosis–respuesta, se recomienda utilizar 1×10^4 células/pocillo para líneas adherentes y 4×10^4 células/pocillo para líneas en suspensión, empleándose células tratadas con 0,14 % de DMSO como control del 100 % de viabilidad en ensayos de citotoxicidad.

(En el caso de investigadores externos, las placas pueden transportarse manteniendo las células en medio completo suplementado con HEPES (10–25 mM) para estabilizar el pH en ausencia de CO₂, durante un tiempo máximo de 30 minutos y en condiciones controladas de temperatura (consulta previa a la técnico). No se realiza cambio de medio tras el transporte.)

Antes de iniciar el ensayo, la placa se equilibra en incubador a 37 °C durante 15–30 minutos. La técnico añade el reactivo alamarBlue directamente al medio (suplementado o no con HEPES) a una dilución final 1:10 (10 µL en 100 µL de muestra), seguido de una incubación de 1 a 4 horas a 37 °C protegida de la luz, pudiendo ser necesario optimizar el protocolo.

La fluorescencia generada, proporcional al número de células viables, se mide en el Varioskan LUX utilizando excitación y emisión recomendadas por casa comercial con medición multipunto para reducir la variabilidad intra-pocillo. Los datos se adquieren en tiempo real.

El análisis de datos se realiza con el software SkanIt™, incluyendo la reducción multipunto, la sustracción del blanco y, cuando procede, la normalización al control sin tratamiento (100 % de viabilidad). Para estudios de dosis–respuesta, los datos se ajustan mediante un modelo logístico de cuatro parámetros (4PL), obteniéndose los valores de EC₅₀/IC₅₀. Los resultados se exportan en formatos gráficos y tabulares.

6. Recepción de muestras

- Las muestras serán entregadas por el investigador o por la empresa transportadora a la hora acordada (antes de las 10:00 de la mañana).
- Se avisará al técnico al menos dos días antes de la recepción con objeto de que las muestras sean colocadas en la disposición requerida y los controles y blancos estén asegurados en posición definida según ensayo, así como reservada campana, incubador y equipo Varioskan.
- Tras la recepción de la muestra, el técnico responsable del área le dará entrada en su hoja de registro y se la identificará con el nombre del investigador, lugar de procedencia y el código indicado por el responsable del proyecto.
- La utilización de campana de flujo e incubador quedan sujetos a la aprobación del técnico del área de cultivos celulares.

7.Precios

Solicitar precios a la plataforma.

8.Contacto:

- **Técnico Especialista Responsable Plataforma de Proteómica**
Dra. Sonia Morales Santana
Mail: smorales@ibsgranada.es
Teléfono: 676131460
- **Coordinadora Laboratorios de Investigación**
Dra. Paloma Muñoz de Rueda
Mail: palomalancha@ibsgranada.es
Teléfono: 958023980
- **Web:** <https://www.ibsgranada.es/plataformas/plataforma-de-genomica-y-proteomica/>
- **Solicitud de recurso:** <https://www.ibsgranada.es/solicitud-de-recursos-de-la-unidad-cientifico-tecnica-de-laboratorios-de-investigacion/>