



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Tesis para obtener el título de: Químico Farmacéutico
Biólogo.

Estandarización de un método para la cuantificación de la
deshidrogenasa láctica (LDH) como indicador de citotoxicidad
y/o muerte celular.

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer
Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer
Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental
Zaragoza.

Director de tesis: M. en C. Luis Sánchez Sánchez.

Asesor de tesis: Q.F.B. Gerardo Díaz Vázquez

Alumno: Jonathan Martínez Chávez

Cd.Mx., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS.

Al Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza dedicado a la Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer donde se realizó mi proyecto de tesis bajo la dirección de M. en C. Luis Sánchez Sánchez y con la asesoría de Q.F.B. Gerardo Díaz Vázquez.

Al programa de becas para titulación de ex alumnos de alto rendimiento para la realización de mi proyecto de tesis.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por los recursos para los materiales, reactivos y equipo, con el proyecto IN222114-3.

Agradezco el apoyo para la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS.

Dedico esta tesis a mi familia por haber sido tan importante en mi formación profesional, especialmente a mi madre por darme el apoyo tanto económico como emocional, sin ella no habría podido formarme como profesionalista.

A mi abuelita Graciela por su apoyo incondicional.

A mi hermana Joyce por sus sabios consejos.

A mi hermano Joel por darme el ánimo de seguir adelante y no rendirme.

A mis compañeros de laboratorio por haberme auxiliado con las técnicas empleadas en este trabajo de tesis.

A mis profesores por darme las bases académicas que utilice en el desarrollo de este proyecto.

Contenido

Agradecimientos.....	i
Dedicatorias	ii
1. Resumen	1
2. Introducción.....	2
3. Marco teórico.....	5
3.1 La célula	5
3.2 Proliferación celular	6
3.3 Ciclo celular.....	7
3.4 Muerte celular.....	9
3.5 Apoptosis.....	10
3.6 Necrosis	11
3.7 Cáncer.....	11
3.8 Cáncer Cervico-Uterino	12
3.9 Ensayos para determinar viabilidad celular	13
3.10 Estructura de la LDH	15
3.11 Isoenzimas	17
3.12 Ciclo catalítico	19
3.13 Cuantificación de LDH.....	21
3.14 Validación de métodos analíticos	25
3.15 Parámetros a evaluar una validación	26
3.15.1 Especificidad (selectividad)	26
3.15.2 Linealidad	26
3.15.3 Precisión.....	27
3.15.4 Exactitud (sesgo).....	27
3.15.5 Estabilidad.....	28
3.15.6 Límite de cuantificación	28
3.15.7 Robustez	28
3.15.8 Tolerancia.....	28
4. Planteamiento del problema.....	29
5. Hipótesis	30
6. Objetivos	31
6.1 Objetivo general	31
6.2 Objetivos particulares	31
7. Material y métodos	32
7.1 Reactivos.....	33
8. Metodología	34
8.1 Validación del sistema.....	36
8.2 Linealidad del sistema	36
8.3 Precisión del sistema	37
8.4 Validación del método	37
8.5 Linealidad del método	37
8.6 Precisión.....	37
8.7 Repetitividad.....	38
8.8 Reproducibilidad.....	38

8.9 Robustez	39
8.10 Tolerancia.....	39
8.11 Estabilidad de la muestra	39
8.12 Estabilidad de la mezcla de sustratos	40
8.13 Estabilidad de las soluciones individuales.....	40
8.14 Límite de detección y límite de cuantificación	40
8.15 Selectividad	41
9. Resultados	42
9.1 Validación del sistema.....	42
9.1.1 Linealidad del sistema	42
9.1.2 Precisión del sistema	43
9.2 Validación del método	44
9.2.1 Linealidad del método	44
9.2.2 Precisión.....	44
9.2.3 Repetitividad.....	45
9.2.4 Reproducibilidad.....	46
9.2.5 Robustez	46
9.2.6 Tolerancia.....	47
9.2.7 Estabilidad de la muestra	48
9.2.8 Estabilidad de la mezcla de sustratos	48
9.2.9 Estabilidad de las soluciones individuales.....	49
9.2.10 Límite de detección y límite de cuantificación	50
9.2.11 Selectividad	51
10. Discusión	52
10.1 Validación del sistema.....	52
10.2 Validación del método	52
11. Conclusiones	57
12. Perspectivas	59
13. Referencias bibliográficas	60

1. Resumen

En el presente trabajo se estandariza un método para la cuantificación de la deshidrogenasa láctica (LDH) como indicador de citotoxicidad y/o muerte celular para ser utilizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza dedicado a la Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer con el fin de sustituir al estuche comercial Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay ayudando así de forma importante en la obtención de datos requeridos para la investigación de nuevos fármacos anticancerígenos y optimizando los recursos al economizar en costos y tiempo.

Aunque se utilizaron células CasKi, Vibo y HeLa para la estandarización del método, este puede ser utilizado con otras líneas celulares en cultivos in vitro.

Y si se desea utilizar el método en otros laboratorios, el método deberá ser estandarizado nuevamente con fines de calidad en los resultados, debido a que las condiciones experimentales, instrumentos, reactivos y materiales, son diferentes en cada laboratorio.

2. Introducción

La aparición de enfermedades crónicas degenerativas como la diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial y cáncer se ha incrementado de la mano con la esperanza de vida actual; son muchos los factores de riesgo que originan el inicio y desarrollo de estas enfermedades, entre los que se encuentran malos hábitos alimenticios y sociales (malnutrición, tabaquismo, alcoholismo, consumo de drogas, diversas parejas sexuales, etc.) y aumento de los contaminantes en el medio ambiente. En los últimos años la incidencia y mortalidad originadas por el cáncer se han incrementado. Así, en el año 2000, los tumores malignos fueron la causa del 12% de los 56 millones de muertes que se produjeron en el mundo por todas las causas¹ según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia mundial del cáncer se estima en el 50%, con 15 millones de casos nuevos en el año² 2020.

**Casos de cáncer Panorama Internacional
2000 - 2020***

Tipos de cáncer	2000		2020	
	Núm.	%	Núm.	%
Pulmón	1,000,200	12.34	2,000,000	13.33
Mama	1,000,100	12.34	2,000,000	13.33
Colon	940,000	11.60	1,700,000	11.34
Estómago	870,000	10.74	1,400,000	9.33
Higado	560,000	6.91	1,000,000	6.67
Cuello uterino	470,000	5.80	800,000	5.33
Esófago	410,000	5.06	800,000	5.33
Cabeza y cuello	390,000	4.81	700,000	4.67
Vejiga	330,000	4.07	600,000	4.00
Hodgkin	290,000	3.58	550,000	3.67
Leucemia	250,000	3.09	500,000	3.33
Próstata y de testículos	250,000	3.09	500,000	3.33
Páncreas	216,000	2.67	400,000	2.67
Ovario	190,000	2.35	380,000	2.53
Riñón	190,000	2.35	390,000	2.60
Endometrio	188,000	2.32	300,000	2.00
Sistema nervioso	175,000	2.16	250,000	1.67
Melanoma	133,000	1.64	250,000	1.67
Tiroides	123,000	1.52	230,000	1.53
Faringe	65,000	0.80	100,000	0.67
Enfermedad de Hodgkin	62,000	0.77	150,000	1.00
Total Mundial	8,102,300	100.0	15,000,000	100.00

Fuente: Informe de Cáncer Organización Mundial de Salud.
* Estimación, Organización Mundial de Salud.

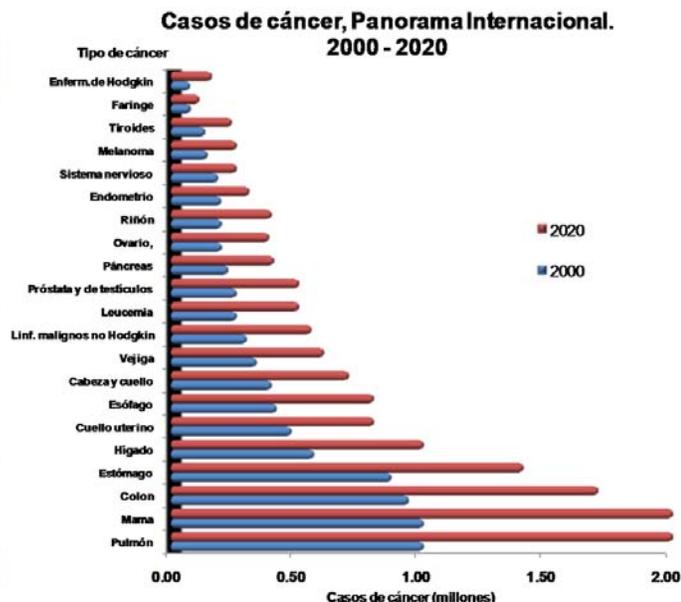


Figura 1. Incidencia del cáncer en el mundo³

Por esta razón, gran cantidad de laboratorios en el mundo se dedican al estudio, elaboración y descubrimiento de nuevos fármacos que puedan ayudar al ser

humano en su lucha por conservar la salud ante estas enfermedades, entre ellas el cáncer que son cada vez más frecuentes.

En la elaboración de nuevos fármacos anticancerígenos, los científicos buscan un compuesto que sea potente, selectivo para células cancerígenas y que promueva la muerte celular por apoptosis para evitar reacciones inflamatorias indeseadas, desarrollando así nuevas alternativas terapéuticas que aumenten la calidad de vida de los pacientes.

Para la determinación de estas características, los investigadores han utilizado diversas técnicas, que ayudan a monitorear los efectos de dichos compuestos sobre las células tanto tumorales como no tumorales, mediante la evaluación de cambios morfológicos, bioquímicos y genéticos, entre otros. En el presente trabajo se presenta la implementación y estandarización de un método colorimétrico que determina indirectamente la presencia de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes de cultivos celulares. Esta enzima es liberada por las células que han sufrido daños graves en la membrana celular y se toma como parámetro de muerte celular necrótica. Este método espectrofotométrico para evaluar LDH, es utilizado con bastante frecuencia en laboratorios dedicados al estudio de compuestos con posible actividad anticancerígena.

De acuerdo a las buenas prácticas tanto de fabricación como de laboratorio, es necesario que todos los métodos analíticos que se utilicen estén validados⁴, los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para su propósito. Por esta razón es de vital importancia estandarizar toda técnica que se utilice en un laboratorio pues de esta forma se comprueba con evidencia documentada que el método analítico es fiable.

La validación de la técnica que se implementará en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza para cuantificar LDH traerá consigo las siguientes ventajas: garantizar la calidad de los resultados obtenidos, reducir los costos por ensayo realizado y

optimizar el tiempo para la realización de esta prueba, ya que existen estuches comerciales que se utilizan para realizar el estudio, pero los costos son elevados por lo que será de ayuda utilizar un método establecido en el laboratorio que sea de igual manera confiable y más económico.

3. Marco teórico

3.1 La célula

Todos los organismos vivos están formados por células: unidades pequeñas rodeadas de una membrana, que contienen una solución acuosa con gran cantidad de moléculas químicas y dotadas de la extraordinaria capacidad para crear copias de sí mismas en el proceso de división en dos células. Los organismos unicelulares son las formas de vida más simples. Los organismos superiores, como el hombre, son comunidades de células que derivan del crecimiento y la división de una célula fundadora única: cada animal, vegetal y hongo es una colonia extensa de células individuales que efectúa funciones especializadas, coordinadas por sistemas de comunicación complejos.⁵

Cada célula que forma nuestro cuerpo puede crecer, reproducirse, procesar información, responder a estímulos y llevar a cabo una asombrosa variedad de reacciones químicas. Estas habilidades definen la vida. Los organismos multicelulares contenemos miles de millones de células organizadas en estructuras complejas, pero muchos organismos sólo son una simple célula. Aun los organismos unicelulares exhiben todas las propiedades que distinguen a lo viviente, lo que indica que la célula es la unidad fundamental de la vida.

El universo biológico se compone de dos tipos de células: procariontes y eucariontes. Las células procariontes constan de un único compartimento cerrado rodeado por la membrana plasmática, carecen de un núcleo definido y tienen una organización interna menos compleja que la de los eucariontes. A diferencia de las procariontes, las células eucariontes contienen un núcleo definido rodeado por una membrana y otros compartimientos internos bien definidos (los orgánulos) rodeados por membranas.⁶

Puede clasificarse a los organismos vivos según el número celular que posean: si sólo tienen una sola célula, se les denomina unicelulares como pueden ser los protozoarios o las bacterias que son organismos microscópicos. Si poseen más de una célula, se les llama pluricelulares. En estos últimos el número de células es

variable: de unos pocos cientos, como en algunos nematodos, a cientos de billones, como en el caso del ser humano. En este tipo de organismos las células guardan una estrecha relación entre sí, organizándose en una estructura jerarquizada y colaborando para mantener un estado de homeostasis en donde las condiciones de un ambiente relativamente constante son sostenidas para sobrevivir. Sin embargo, cada uno de los diferentes linajes de células que conforman al organismo tiene un micro ambiente particular en el cual se reúnen las condiciones necesarias para el establecimiento de una densidad celular requerida para conservar la estructura de un tejido o de un órgano.⁷

El mantenimiento de la estructura que constituye a un organismo pluricelular requiere de señales celulares que permitan a un tejido u órgano crecer o detener su crecimiento. Estas señales guardan un equilibrio entre proliferación, diferenciación y muerte celular, procesos que están enmarcados dentro de lo que se denomina ciclo celular.⁸

3.2 Proliferación celular

La proliferación celular es un evento biológico que tiene como objetivo que la célula se divida, dando origen a dos células genéticamente idénticas. Este evento se regula mediante señales químicas que la activan o la inhiben. Las células presentan diferentes ritmos de proliferación lo cual depende del tejido del cual formen parte. Además de las células especializadas que no se dividen después de su diferenciación, se tienen a otras que se dividen de manera regular y a ritmo acelerado, entre estos dos extremos se encuentran aquellas que se dividen lentamente o que no se dividen, pero que pueden llegar a ser estimuladas por factores de crecimiento secretados por células vecinas o localizadas en tejidos u órganos distantes y que actúan de manera autocrina, paracrina o endocrina.

Las células necesitan señales procedentes de otras células, no solamente para proliferar, sino también para sobrevivir. Si se les priva de tales factores de supervivencia, las células activan un programa intracelular de suicidio y mueren por un proceso denominado muerte programada o apoptosis. El hecho de

necesitar señales procedentes de otras células para poder sobrevivir ayuda a garantizar que las células sobrevivan sólo cuándo y dónde son necesarias. Estos mecanismos de control y autocontrol, se mantienen regulados, gracias a la actividad del ciclo celular.⁵

3.3 Ciclo celular

El ciclo celular es el conjunto mínimo de procesos que una célula tiene que realizar para que puedan llevar a cabo su tarea más importante: la transmisión de la información genética a la siguiente generación de células. De esta forma una célula se reproduce mediante una secuencia ordenada de interruptores bioquímicos, que controlan los principales acontecimientos del ciclo, incluyendo la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la segregación de los cromosomas replicados para culminar con la división, obteniendo dos células hijas.⁹

El ciclo celular puede describirse en cinco fases bien definidas: G₀, G₁, S, G₂ y M. Éste es un proceso altamente ordenado que termina con la duplicación y transmisión de la información genética de una generación celular a otra. La fase G₁ es el periodo en el que la célula empieza a prepararse para la división por lo que especialmente al principio de esta fase se presenta una activa síntesis de ARN y proteínas, además de otros componentes celulares por lo que la célula aumenta de tamaño. La fase S es un periodo que transcurre con la síntesis del ADN, está culmina con la duplicación del material genético, formándose una copia exacta. La replicación del ADN no modifica el aspecto del núcleo celular. La fase G₂ es el periodo donde tiene lugar un crecimiento interior, pero además actúa como un periodo de seguridad durante el cual la célula controla y verifica que todo el ADN se haya duplicado en forma correcta antes de comenzar la mitosis. M es la fase donde se presenta la división del material genético y la división celular siguiendo una serie de pasos progresivos: profase, metafase, anafase y telofase. Como producto de esta división se obtendrán dos células hijas con idéntico contenido genético. G₀ se refiere a las células que se encuentran temporal o permanentemente fuera del ciclo (ver Figura 2).

La duración de los periodos de división G1, S, y G2/M dependen del tipo celular que se trate. Así en células de epitelio humano la duración es de 8 horas, en otros tipos de células puede ser de varios días o meses. También depende de las condiciones fisiológicas y de determinados factores y, en particular de la temperatura.⁶



Figura 2. El ciclo celular es una ordenada serie de eventos, que se requieren para la replicación celular. Se compone principalmente de cuatro fases: G0, G1, S, G2 (interfase) y una fase de división celular conocida como Mitosis⁶.

El tiempo en que se lleva a cabo el ciclo celular varía dependiendo del tipo de célula como se muestran la tabla 1. Es por eso que en los ensayos para la estandarización en la determinación de la LDH los cultivos celulares se dejan

incubando por 24 horas, pues las células CasKi, Hela y ViBo que son células cancerígenas de cérvix sobre las que se estandarizó el método, se duplican aproximadamente cada 24 horas cuando tienen las condiciones y los factores de crecimiento adecuados.

Tabla 1. Duración de algunos ciclos celulares

Células	Tiempo
<i>Escherichia Coli</i>	20 minutos
Levadura	1.5 – 3 horas
Embrionarias de rana	30 minutos
Epitelio intestinal	12 horas
Fibroblasto de mamífero	20 horas
Hepatocitos humanos	1 año
Humanas cultivo primario	24 – 96 horas
Humanas cancerígenas	12 – 24 horas

3.4 Muerte celular

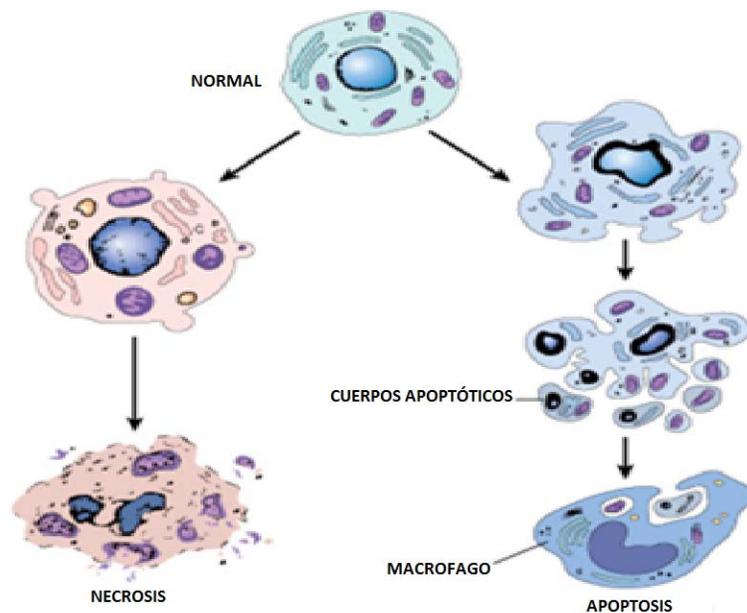


Figura 3. Esquemización de muerte por necrosis a la izquierda, en la cual podemos observar como la célula vierte todo su contenido hacia el exterior, provocando una respuesta inflamatoria. A la derecha, observamos la muerte por apoptosis en la cual podemos ver cómo es que se encapsula el contenido de la célula provocando lo que conocemos como cuerpos apoptóticos, que finalmente son fagocitados por los macrófagos¹⁰.

En los organismos pluricelulares, cuando una célula ha dejado de ejercer su función o cuando representa una amenaza para el organismo, es eliminada a través de un mecanismo suicida, que se conoce, como muerte celular programada. Dos formas de muerte celular son habituales en el organismo: necrosis y apoptosis (ver Figura 3).

3.5 Apoptosis

La apoptosis es un tipo particular de muerte celular, la cual puede ser distinguida por un patrón característico de cambios morfológicos y moleculares. Debido a una deshidratación rápida, las células originalmente redondeadas llegan a presentar una forma elongada y disminuyen su tamaño. La condensación y pérdida de la estructura distintiva de la cromatina se presentan al mismo tiempo de la contracción celular, inicia en la periferia del núcleo y es seguida por la fragmentación nuclear. Los fragmentos nucleares junto con las biomoléculas del citoplasma, incluyendo orgánulos intactos son empacados en los llamados cuerpos apoptóticos, los cuales, envueltos en la membrana plasmática, se separan de la célula muerta. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células especializadas sin provocar una respuesta inmune.

El incremento en la concentración de calcio citoplasmático y la activación de las proteasas, así como endonucleasas, las cuales degradan el ADN en las secciones internucleosomales, son también eventos característicos de la apoptosis. También es típica la activación de algunos genes cuyos productos son requeridos para la apoptosis. Cuando los estados de la apoptosis avanzan, la integridad estructural y funcional de la membrana celular, la mitocondria y lisosomas es preservada. Considerando todos los cambios que ocurren en la célula que experimentan apoptosis, la característica más común de éste proceso es la participación activa de la célula en su muerte. La célula activa una cascada de eventos moleculares que resultan en una degradación ordenada de los constituyentes celulares con un impacto mínimo en las células vecinas.¹¹

3.6 Necrosis

La necrosis es definida frecuentemente como un fenómeno pasivo y degenerativo que es una consecuencia de un trauma ambiental. El evento primario en la necrosis es un hinchamiento de la mitocondria seguida de la ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido citoplasmático al medio extracelular entre ellos la LDH. La autólisis involucra hinchamiento de los lisosomas, dilatación del retículo endoplásmico, una pérdida de enzimas y proteínas y una pérdida resultante de compartimentalización celular.¹⁰

La necrosis se presenta generalmente en respuesta a un daño severo y es inducida frecuentemente por una sobredosis de agentes citotóxicos o por agentes dañinos como hipoxia, hipertermia, hipotermia, infecciones virales líticas y venenos. Tal estímulo letal incrementa generalmente la permeabilidad de la membrana plasmática con cambios estructurales que afectan los poros y canales de la membrana o por inhibición de las bombas de iones de la membrana. Mientras que una participación activa de la célula afectada involucra la síntesis de proteínas *de novo*, característica esencial en la apoptosis, la necrosis es un fenómeno degenerativo, cuya consecuencia final es la liberación del contenido citoplasmático hacia el exterior, con la consecuente respuesta inflamatoria.¹⁰

3.7 Cáncer

La mayoría de los mecanismos de control (si no es que todos) se originan y operan en el núcleo y son finalmente el resultado de la actividad de los genes. Cuando alguno de estos mecanismos de control falla, se altera la actividad genómica y consecuentemente, la homeostasis celular debido a una alteración estable heredable en el material genético de las células.¹²

Las células una vez transformadas en cancerígenas presentan diferentes cambios morfológicos, además, las células neoplásicas pierden la capacidad de inhibir su crecimiento por contacto y algunas suelen expresar antígenos específicos de cáncer en su membrana.

Las causa de esta enfermedad no se tiene bien establecida ya que son diversos los factores que conllevan a esta los hay físicos, químicos, mutaciones espontaneas y en algunos casos se desconoce cuál es la causa. De este modo, lesiones producidas por radiaciones, virus o mutaciones aleatorias espontaneas activarían o desactivarían algunos elementos de esa red reguladora, produciendo finalmente la malignización.^{13,14} Los cambios cromosómicos y somáticos que se generan durante la progresión del cáncer son de diversa naturaleza tanto genética como epigenética (factores genéticos que son determinados por el ambiente celular en lugar de por la herencia).^{15,16}

Sin embargo, “los genes que participan en el desarrollo del cáncer corresponden a 3 categorías:

- I. Proto-oncogenes y oncogenes (genes que promueven el crecimiento);
- II. Genes supresores de tumores o anti-oncogenes (genes que inhiben el crecimiento), y
- III. Genes de control o revisión (“check-point genes”) que supervisan la calidad del ADN en determinadas etapas del ciclo celular y deciden si la célula se repara o se destruye por apoptosis.¹²

3.8 Cáncer Cervico-Uterino

La validación del método que se pretende con esta tesis se realizara sobre células cancerígenas, específicamente sobre líneas celulares de cáncer Cervico-uterino (CaCU): CasKi, HeLA y ViBo, sin embargo este método puede utilizarse para otros tipos celulares siempre y cuando el principio de lisis de la membrana celular mediante detergentes sea viable.

En diferentes reportes de tipo epidemiológico, se han determinado diversos factores de riesgo asociados al desarrollo del CaCU, como el número de parejas sexuales, inicio temprano de vida sexual activa, multiparidad, entre otros.¹⁷

Sin embargo, el factor etiológico más importante para el desarrollo del CaCU es la infección con virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) ^{18,19} principalmente los tipos²⁰ 16 y 18.

Se ha demostrado que los genomas de los VPH-AR usualmente se integran al genoma de la célula hospedera. Esta integración se realiza en diversos sitios, algunos de ellos cercanos a oncogenes específicos o sitios frágiles, sugiriendo que este evento puede tener un papel importante en el desarrollo de los tumores cervicales.²¹

La propiedad oncogénica principal de las proteínas virales E6 y E7 es su capacidad de inactivar a las proteínas celulares supresoras de tumor^{22,23} pRB y p53 respectivamente, permitiendo así la transformación e inmortalización de las células infectadas. La inactivación de los genes supresores de tumor, ya sea por mutaciones génicas o por presencia de virus genera la desregulación del ciclo celular y la activación de varios protooncogenes.²⁴

3.9 Ensayos para determinar viabilidad celular

Es de gran importancia la determinación de la viabilidad celular y toxicidad, así como el tipo de muerte que presentan las células tras la exposición en un ambiente exógeno concreto, pues al conocer estos parámetros, el estudio de los mecanismos intracelulares que se llevan a cabo en diversos fenómenos biológicos se facilita.

La distinción entre células vivas y muertas se realiza de varias formas. Suele cuantificarse aprovechando la capacidad que sólo poseen las células vivas de excluir (eliminar tras la absorción) colorantes vitales como azul tripano, eritrosina B, violeta ácida, azul nitrotetrazolio, metosulfato de fenacina, rodamina 123 o bromuro de etidio.^{25,26,27} Por el contrario, sólo las células vivas absorben colorantes como rojo neutro, ácido 4-acetamido-4-isotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico o diacetato de fluoresceína.^{28,29}

También se sabe que el grado de adhesión de las células a la superficie de cultivo es proporcional al estado de salud de las mismas, Pueden evaluarse contando las células adheridas o despegadas, midiendo el intercambio celular tras marcaje isotópico o por tinción selectiva del ADN y evaluación fluorimétrica o por citometría de flujo.³⁰

Tradicionalmente, los dos métodos más utilizados son los ensayos de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) y LDH (ambas utilizan sales de tetrazolium) que valoran la viabilidad celular y la citotoxicidad, respectivamente.³¹

El MTT se reduce a formazan a nivel mitocondrial sólo cuando las reductasas mitocondriales están activas, dependiendo así directamente del número de células vivas y viables. Posteriormente el formazan se solubiliza, habitualmente con dimetil sulfoxido (DMSO) y se obtiene una solución de color azul-violeta que puede leerse por espectrofotometría. Los cultivos no tratados servirán de controles frente a los cultivos tratados en los que se podrá determinar la reducción de la viabilidad celular respecto al control, los resultados se expresan habitualmente como porcentajes. Este tipo de ensayo permite recoger y guardar el medio de cultivo para posteriores análisis, pero su principal desventaja consiste en que si se da una proliferación celular significativa y desigual entre los grupos de estudio, puede confundir los resultados.³²

La citotoxicidad es determinada mediante la evaluación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH), una enzima estable normalmente presente en el citosol de todas las células, la cual es rápidamente liberada al exterior cuando hay daño celular.

La actividad de la LDH puede ser determinada mediante una reacción enzimática en la cual la LDH oxida el lactato dando piruvato, el cual reacciona luego con una sal de tetrazolium convirtiéndola en formazan. El incremento en la cantidad de formazan producido en el sobrenadante de cultivo se correlaciona directamente

con el número de células muertas, todo esto medido por espectrofotometría en base a la absorbancia de las muestras.

3.10 Estructura de la deshidrogenasa láctica (LDH)

La deshidrogenasa láctica o LDH, es una enzima del metabolismo intermedio presente en todas las células del organismo bajo cinco formas o isoenzimas diferentes.

Los distintos tejidos contienen diferentes cantidades y formas de esta enzima, en corazón, riñón, cerebro y eritrocitos se presenta de LDH-1 y las isoenzimas LDH-2, LDH-3 y LDH-4 se presentan en pulmón, bazo, glándulas endocrinas nódulos linfáticos y plaquetas, la LDH-5 se encuentra fundamentalmente en hígado y músculo esquelético.^{33,34} la isoenzima LDH-1 predomina en tejidos ricos en aporte de oxígeno con metabolismo oxidativo, mientras la LDH-5 es la principal forma hallada en el músculo esquelético, al tratarse de un tejido con glucólisis anaerobia, con acumulación de lactato y piruvato.³⁵

En condiciones fisiológicas la LDH ayuda a la homeóstasis del organismo, participando en la fermentación homoláctica, en el músculo durante una actividad intensa cuando la demanda de adenosín trifosfato (ATP) es alta y el suministro de oxígeno es escaso. Este se sintetiza en gran parte por medio de la glucólisis anaerobia que produce ATP rápidamente, en vez de hacerlo mediante la fosforilación oxidativa, un proceso más lento. Bajo estas condiciones la LDH cataliza la oxidación de NADH por piruvato para producir NAD⁺ y lactato.³⁶

A esta reacción a menudo se le conoce como la reacción 11 de la glucólisis. La reacción de la LDH es libremente reversible, de esta manera las concentraciones de piruvato y lactato se equilibran con facilidad.

El lactato representa de cierta forma un callejón sin salida para el metabolismo anaeróbico de la glucosa. Puede exportarse fuera de la célula o convertirse nuevamente en piruvato. Gran parte del lactato que se produce en las células es

transportado por la sangre hacia el hígado, donde se utiliza para sintetizar glucosa.³⁶ En un proceso conocido como el ciclo de Cori.

La forma activa de la LDH es un tetrámero de 4 subunidades, cada una de las cuales es una cadena polipeptídica de 334 aminoácidos. Las subunidades ocupan posiciones equivalentes en el tetrámero y cada monómero tiene un centro o sitio activo. La LDH cataliza según la situación metabólica, la reducción del piruvato a lactato dependiente de NADH o la oxidación del lactato a piruvato dependiente de NAD⁺.

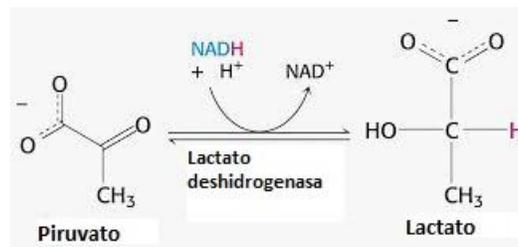


Figura 4. Reacción de la enzima LDH.

En la parte 2 del recuadro A de la Figura 5 se representa esquemáticamente el centro activo de una de las subunidades de la LDH. El esqueleto de la cadena polipeptídica se representa como una banda (de color azul claro) y además se representan el sustrato (lactato en rojo), la coenzima NAD⁺ (en color amarillo) y tres aminoácidos de la cadena lateral (Arg-109, Arg-171 e His-195, en color verde) que participan directamente en la catálisis. En el esquema se ha resaltado un fragmento o bucle peptídico (en color violeta) que comprende los residuos de aminoácidos 98 a 111. En ausencia del sustrato y de la coenzima esa estructura parcial está doblada y deja libre el sitio de entrada del sustrato (no se muestra en la figura).³⁰

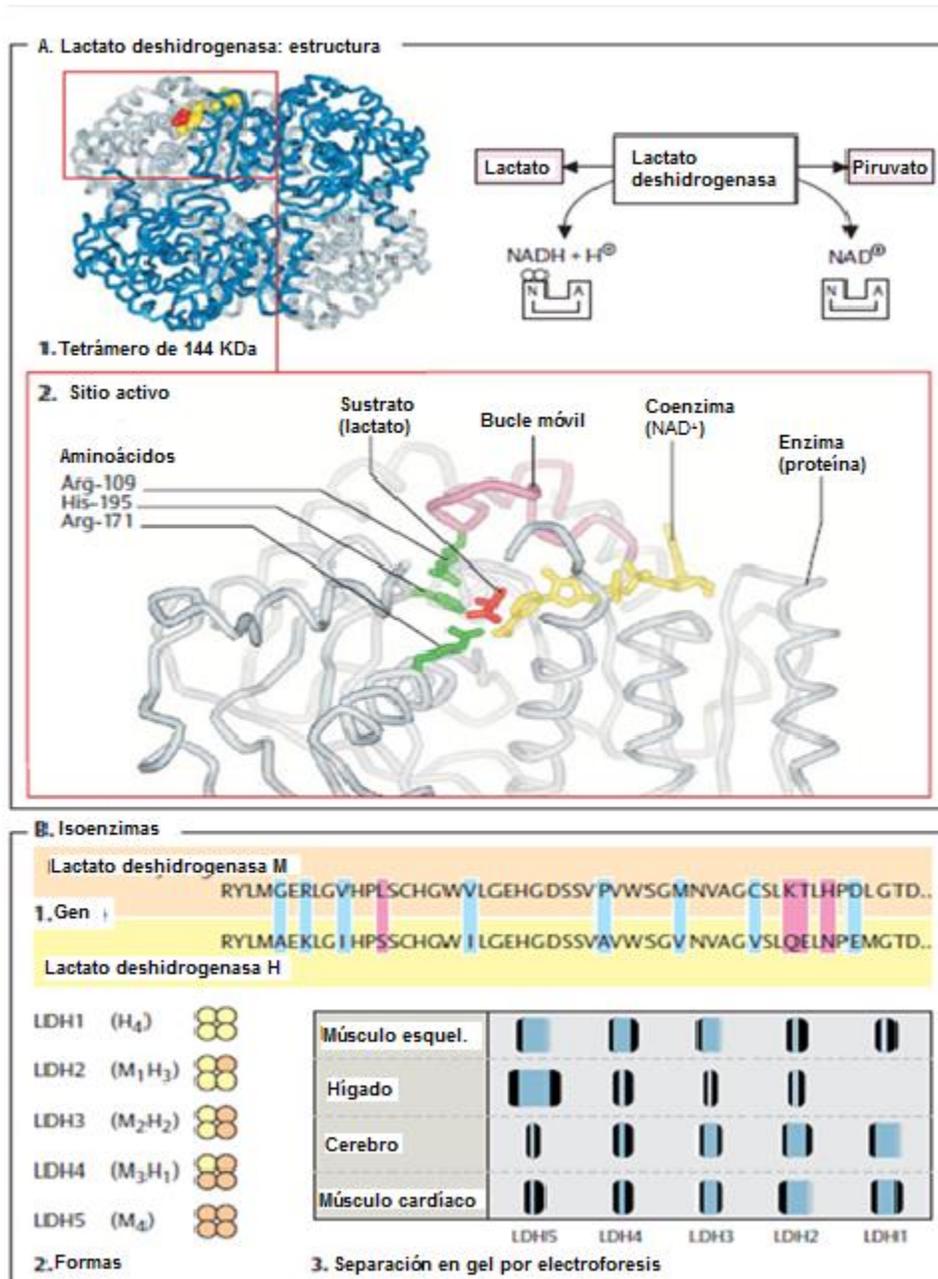


Figura 5. Representación esquemática del centro activo de una de las subunidades de la LDH²⁹.

3.11 Isoenzimas

En el organismo hay dos subunidades (M y H) diferentes de LDH con una secuencia de aminoácidos algo distintos y por eso también diferentes propiedades catalíticas. Como estas dos subunidades pueden asociarse en tetrámeros al azar, en el cuerpo existen en total 5 isoenzimas diferentes de la LDH.

En la parte 1 del recuadro B de la Figura 5 se reproducen porciones de la secuencia de aminoácidos de ambas subunidades en la forma de escritura de una sola letra. Es posible que en algún momento del curso de la evolución un precursor genético común se haya duplicado. Después ambos genes se desarrollaron por mutación y selección, en forma independiente uno del otro. Las diferencias de la secuencia entre las subunidades M y H son predominantemente conservadoras, es decir, que ambos residuos son del mismo tipo, por ejemplo glicina (G) y alanina (A) o arginina (R) y lisina (K). Más raramente se trata de cambios no conservadores, por ejemplo lisina (K) por glutamina (Q) o treonina (T) por glutamato (E). En su totalidad la subunidad H contiene más residuos ácidos y menos residuos básicos que la subunidad M y por eso presenta una fuerte carga negativa. Esta propiedad es aprovechada para la separación de las isoenzimas por electroforesis (ver figura 5 recuadro B. 2,3). La mayor velocidad de corrida corresponde a la isoenzima LDH-1. Compuesta por cuatro subunidades H (H₄), y la menor velocidad a la isoenzima LDH-5. Compuesta por cuatro subunidades M (M₄).³²

La separación y análisis de las isoenzimas en muestras de sangre tiene importancia para el diagnóstico de determinadas enfermedades. Normalmente se encuentran en el suero muy bajos valores de actividad enzimática. En caso de daño de órganos pasan enzimas intracelulares a la sangre y ahí pueden ser detectadas (diagnóstico por enzimas séricas). Mientras que la actividad total de una enzima refleja la gravedad del daño, el tipo de isoenzimas encontradas en la sangre aporta indicios acerca del lugar de la lesión celular porque los respectivos genes tienen una expresión muy diferente en los distintos órganos. Así, el hígado y los músculos esqueléticos presentan predominantemente subunidades M (M de músculo) de la LDH, mientras que el cerebro y el músculo cardíaco expresan principalmente subunidades H (H de heart, en inglés corazón). Como consecuencia de ello existe un patrón de isoenzimas para cada órgano. Por ejemplo, después de un infarto cardíaco aumenta en gran medida la cantidad de LDH-1 en sangre mientras que la concentración de LDH-5 apenas se modifica. También son importantes para el diagnóstico las isoenzimas de la creatincinasa.³²

3.12 Ciclo catalítico

La LDH cataliza la transferencia de iones hidruro del lactato al NAD^+ o del NADH al piruvato. El equilibrio de la reacción está desplazado hacia la formación del lactato pero cuando hay concentraciones altas de lactato y de NAD^+ es posible que ocurra la oxidación del lactato hasta piruvato.

La LDH cataliza la reacción en ambos sentidos con actividad alta pero, como todas las enzimas, no influye sobre la dirección del equilibrio químico.

Debido a la reversibilidad de la reacción, el proceso catalítico puede representarse como un circuito cerrado. El ciclo catalítico de la LDH se representa en la Figura 6 en seis momentos diferentes. Los pasos intermedios de la catálisis son muy breves y por ende muy difícil de comprobar; su existencia ha sido deducida de manera indirecta de muchos hallazgos experimentales.

En el centro activo de la LDH hay numerosos aminoácidos que permiten la unión de los sustratos y la coenzima o actúan directamente durante el paso en el que ocurre la catálisis. En la Figura 6 se muestran solo las cadenas laterales de tres residuos especialmente importantes. El grupo guanidina con carga positiva de la arginina-171 se une al grupo carboxilato del sustrato por interacciones electrostáticas. El grupo imidazol de la histidina-195 sirve para la catálisis ácido-base y la cadena lateral de la arginina-109 es importante para la estabilización del estado de transición. A diferencia de la His-195. Cuya carga eléctrica se modifica durante la catálisis, los dos residuos esenciales de la arginina están siempre protonados. Además de estos tres residuos, se muestra en forma esquemática (y en color rojo) el bucle peptídico 98-111. Su función consiste en cubrir el sitio activo después de la unión del sustrato y la coenzima para que de esta manera se eliminen moléculas de agua durante la transferencia de electrones.

Si se observa la figura 6 en los pasos de la reducción catalítica del piruvato por medio de la LDH (paso 1) se comprueba que en la enzima libre la His-195 está protonada. Por tal motivo esta forma se denomina E-H^+ . Después se une la coenzima NADH (paso 2) y luego el piruvato (paso 3). Es importante que en la

enzima el grupo carbonilo del piruvato y el sitio activo del anillo de la nicotinamida de la coenzima queden situados relativamente juntos y puedan fijarse (aproximación y orientación del sustrato). Finalmente se cierra el bucle 98-111 sobre el centro activo, la intensa disminución de la polaridad durante el proceso facilita la formación del estado de transición (paso 4; exclusión de agua). En el estado de transición un ion hidruro H^- es transferido por la coenzima al carbono del carbonilo (transferencia de grupos). La carga negativa del oxígeno, desfavorable energéticamente y que aparece un momento, se estabiliza por interacciones electrostáticas con la Arg-109 (estabilización del estado de transición). Al mismo tiempo se transfiere un protón de la His-195 a este átomo de oxígeno (transferencia de grupos) y se obtienen lactato y NAD^+ como productos unidos a la enzima (paso 5). Después de la apertura del bucle el lactato de la enzima se disocia y el grupo imidazol de His-195 sin carga que se forma transitoriamente vuelve a fijar un protón del agua circundante (paso 6). Por último se libera también la coenzima oxidada NAD^+ y se alcanza nuevamente el estado inicial (paso 1). Como se muestra en el esquema, el protón que se obtiene en la reacción de equilibrio ($NADH + H^+$) no se une con el NADH sino después de la liberación del lactato, es decir entre los pasos 5 y 6 del ciclo anterior.

Durante la oxidación del lactato hasta piruvato se llevan a cabo los mismos pasos pero en sentido inverso. Como ya se mencionó, la dirección que adopte la reacción no depende de la enzima sino de la situación de equilibrio, es decir de las concentraciones de los reactantes y el valor del pH.³²

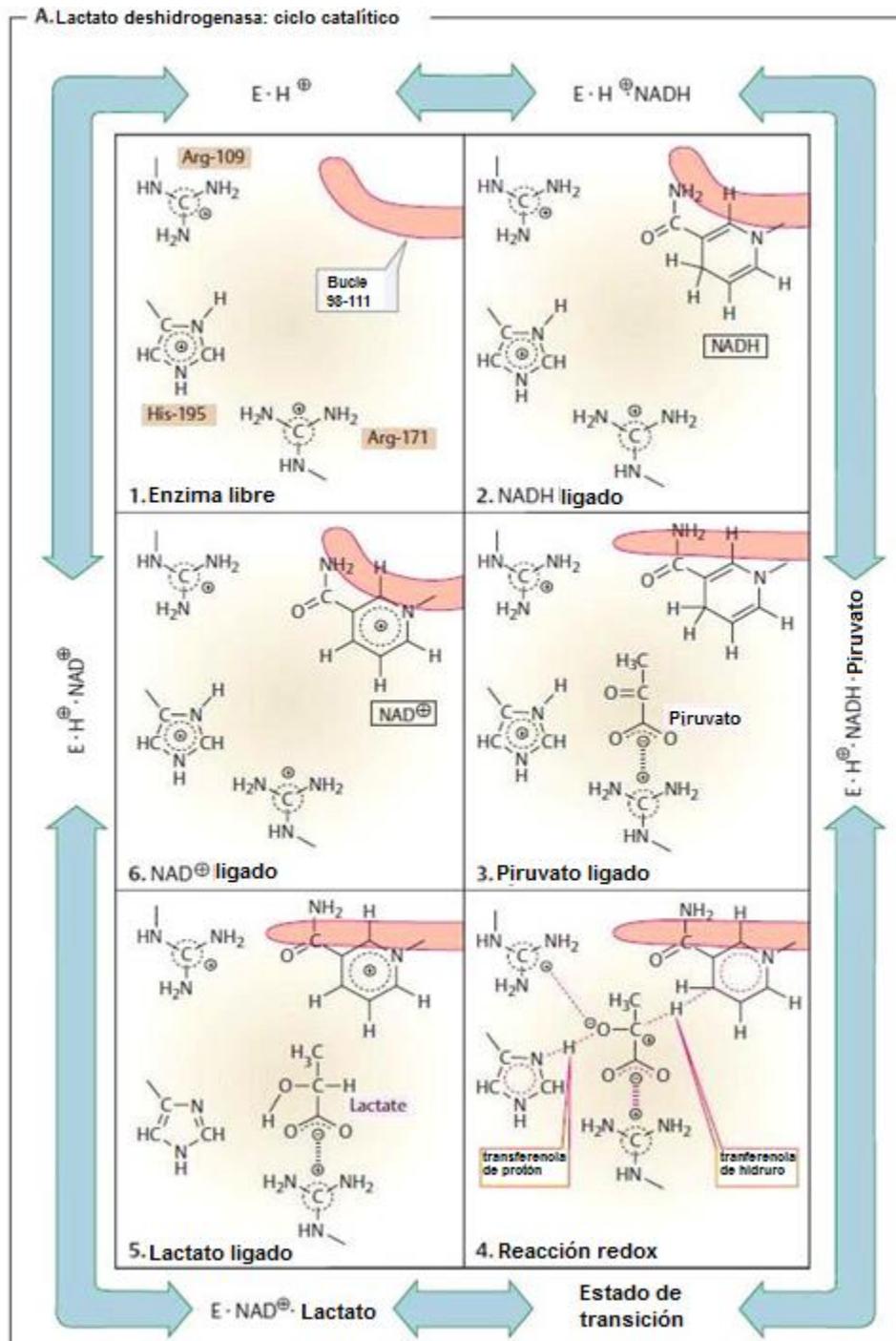


Figura 6. Ciclo catalítico de la LDH³².

3.13 Cuantificación de LDH

La LDH se acumula en el medio de cultivo cuando las células pierden integridad de la membrana celular por citotoxicidad. Actualmente, existen diferentes estuches

comerciales que permiten detectar la presencia de LDH por colorimetría utilizando un espectrofotómetro. Es importante tener en cuenta que la enzima LDH está presente en sueros animales y que esto puede confundir los resultados si se usan medios con suero.³⁷

Ya que la LDH es liberada tras la lisis o daños en la membrana celular, ésta puede ser media en el sobrenadante de los cultivos. Se mide con un ensayo enzimático que dura unos minutos, la velocidad de reacción es dependiente del pH en la mezcla de sustratos, como resultado final se produce la reducción de una sal de tetrazolium a formazan que es un producto insoluble colorido el cual puede medirse por espectrofotometría con un pico máximo de 490nm (ver figura 7).

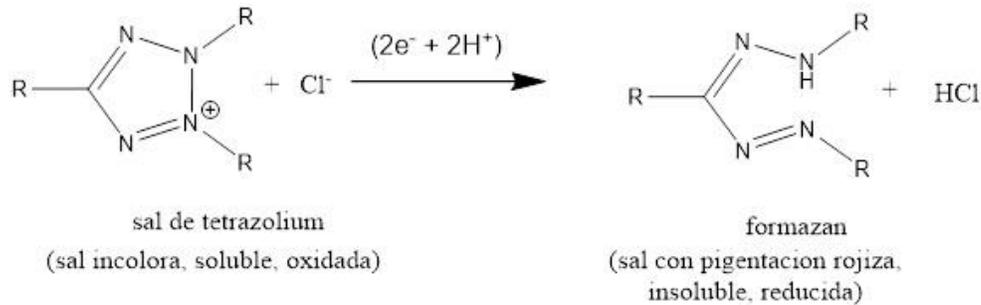


Figura 7. La reducción de una sal de tetrazolium causa la formación de un precipitado insoluble de coloración intensa, conocido con el nombre de sal de formazan.

La cantidad de color formado es proporcional al número de células lisadas. Los datos de absorbancia de longitud de onda se recogen usando un lector de placas, pues lo más común es que este ensayo se lleve a cabo en una placa de 96 pozos. El ensayo puede ser usado para medir la integridad de membrana para ensayos de citotoxicidad mediada por células en la que se lisa una célula diana por una célula efectora, o para medir la lisis de células diana por bacterias, virus, proteínas, productos químicos, entre otros. Este ensayo se puede usar para determinar la citotoxicidad general o para determinar el número total de células.³⁸

Este método es una alternativa colorimétrica para el ensayo de citotoxicidad en donde se utiliza ⁵¹Cr, este método consiste, brevemente, en lo siguiente: Las células diana (que expresan los antígenos determinados en su membrana) son marcadas con Cromo 51 y puestas en contacto en una proporción adecuada con

las células efectoras (CD 8, NK, etc). Tras incubar ambas poblaciones celulares conjuntamente por un periodo de incubación determinado, se centrifugan y seguidamente una parte del sobrenadante resultante es medido mediante un contador de partículas gama para conocer el porcentaje de cromo 51 liberado al medio. A mayor cantidad de cromo liberado mayor actividad citotóxica.

Los métodos para determinar LDH que usan sales de tetrazolium en conjunto con diaforasas (grupo de enzimas capaces de eliminar hidrógeno de los sustratos y transferirlo a otra sustancia aceptora) o algún otro mediador de electrones se han estado utilizando desde hace varios años.³⁹ Modificaciones de esta metodología han reportado variaciones en las mediciones de citotoxicidad que son idénticas (dentro del error experimental) a los valores determinados en paralelo en ensayos con ⁵¹Cr.^{40,41}

Dentro de las ventajas de usar este método se encuentran: se eliminan la impresión de los resultados en papel y los problemas relacionados con la seguridad necesaria al trabajar con compuestos radiactivos, permite el uso de placas estándares comerciales de 96 pozos y es posible detectar niveles bajos de toxicidad.

En las diferentes técnicas espectrofotométricas para la determinación de LDH que se revisaron bibliográficamente, hay ligeras variaciones en los reactivos empleados, sin embargo todos tienen el mismo principio: el cambio de color en la mezcla de sustratos debido a una serie de reacciones de óxido-reducción, que finalmente concluyen con la reducción de una sal de tetrazolium y este cambio de color puede ser medido en base al cambio de absorbancia a una longitud de onda de 490 o 492nm.³⁸

El cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium fue la primer sal utilizada para la medición de la LDH, a partir de esta sal los investigadores probaron otros tipos de compuestos que tuvieran incorporados grupos donadores de electrones en los sustituyentes fenilos de los nitrógenos 2 y 3 de la sal de tetrazolium, uno de los mejores compuestos que surgió a partir de estos ensayos es el cloruro de 3-(4-Iodofenil)-

2-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazol-3-ium (INT).³⁸ El uso del INT como aceptor de hidrógeno junto con el metosulfato de fenazina como intermediario acarreador de electrones permitió el desarrollo de una técnica sensible para medir la actividad de la LDH mediante colorimetría, aunque en la actualidad algunas técnicas utilizan encimas como intermediario acarreador de electrones lo que hace un poco más específica la reacción.

El PMS es reducido de manera no enzimática por el NADH y el NADPH, también por el ditionito, el borohidruro de sodio, ácido ascórbico, ubiquinonas reducidas y vitamina k reducida. Sin embargo el uso del PMS para la detección específica de deshidrogenasas ha sido ampliamente reportado.³⁹

Otra de las variaciones de esta técnica es el buffer que se utiliza, puede ser 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol conocido simplemente como buffer TRIS o buffer fosfato salino conocido por sus siglas en inglés como PBS, cuando se utiliza este, debe ser suplementado con gelatina al 1% o albumina de suero bovino, debido a que como la forma reducida del INT es insoluble en agua, estas proteínas en la mezcla de reacción ayudan a formar un coloide lo cual mantiene la distribución homogénea del INT en la solución para obtener una correcta medición en la absorbancia, este efecto también es logrado con el buffer TRIS a altas concentraciones.

Entonces el rol de cada reactivo en la reacción es el siguiente: el buffer TRIS: mantendrá el pH en 8 y formara coloides con la sal reducida, el dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada (NAD⁺); funcionara como co-enzima, el lactato de sodio; funcionara como sustrato, el metosulfato de fenazina (PMS); funcionara como catalizador y el INT; al ser reducido dará el cambio de color medible. Todo esto sucederá cuando reaccione la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) proveniente de cultivos celulares oxidando al lactato al mismo tiempo que reducirá al NAD⁺ a NADH, el NADH reducirá al INT en donde el PMS actuara como mediador de electrones para finalmente obtener con ello la cuantificación de la actividad enzimática.

3.14 Validación de métodos analíticos

La validación de las técnicas utilizadas, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables. Validar un método consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos, previamente establecidos por el usuario para poder resolver un problema analítico particular. Estos requisitos son los que definen los parámetros o criterios de calidad que debe poseer una técnica a utilizar para resolver el problema analítico.⁴

Los laboratorios deben validar todos los métodos que se utilicen en él, tanto los desarrollados por ellos mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas o desarrolladas por otros. Además, también es necesario que el laboratorio valide los métodos de referencia cuando se trata de un producto terminado, ya que los excipientes utilizados por el laboratorio en la formulación del mismo son completamente diferentes. Así mismo, el laboratorio debe validar todo el procedimiento analítico teniendo en cuenta el intervalo de concentraciones y de matrices de las muestras de rutina. Los criterios de calidad que al menos deben verificarse son la exactitud, la precisión y la incertidumbre de los resultados obtenidos con el método ya que, de esta forma, se obtienen resultados rastreables y comparables.⁴

La validación de un método analítico es el proceso mediante el cual se establece por medio de estudios de laboratorio que las características representativas de dicho método cumplen con las especificaciones para su aplicación. La validación debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de la aplicación en cuestión.⁴

3.15 Parámetros a evaluar en una validación

3.15.1 Especificidad (selectividad)

Este parámetro se relaciona con el grado en que otras sustancias interfieren en la identificación y, si procede, en la cuantificación de los analitos de que se trate. Mide la capacidad del método para identificar/cuantificar los analitos en presencia de otras sustancias, endógenas o exógenas, en una muestra de la matriz en las condiciones exigidas por el método. La especificidad se determina añadiendo materiales que podrían encontrarse en la muestra. Por ejemplo, para hacer un ensayo de la especificidad de un método inmunológico aplicado a especímenes biológicos pueden utilizarse sustancias que potencialmente reaccionen entre sí; una prueba de la especificidad de un método visual sería añadir sustancias interferentes que puedan ocultar o enmascarar la reacción de color; un método cromatográfico para determinar la concentración de drogas ilícitas en muestras clínicas no debe admitir interferencias por parte de los fármacos que se utilicen simultáneamente. La especificidad depende de la concentración y debe determinarse el margen de error de calibración en su nivel más bajo. La validación debe garantizar el buen funcionamiento del método, y que éste distingue los efectos de las impurezas, las sustancias que reaccionan entre sí, etc., que podrían estar presentes en la matriz.⁴²

3.15.2 Linealidad

Tradicionalmente se considera que un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la respuesta obtenida cuando se aplica el método y la concentración del analito en la matriz dentro del rango de concentraciones del analito buscado (rango de trabajo). El rango de trabajo viene definido por la finalidad del método y puede representar sólo una parte de la totalidad de la línea recta.⁴²

3.15.3 Precisión

Precisión (en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad)

La precisión mide el grado de acuerdo entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas en las condiciones previstas en el método. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. Las condiciones en que se mide la precisión se dividen, según opinión general, en condiciones repetibles y condiciones reproducibles. La repetibilidad de las condiciones existe cuando el mismo analista analiza muestras el mismo día y con el mismo instrumento (por ejemplo, cromatógrafo en fase gaseosa) o los mismos materiales (por ejemplo, reactivos para pruebas visuales) y en el mismo laboratorio. Cualquier cambio de estas condiciones (por ejemplo, diferentes analistas, diferentes días, diferentes instrumentos, diferentes laboratorios) implica que las condiciones sólo serán reproducibles. La precisión normalmente se mide en términos de coeficiente de variación o desviación típica relativa de los resultados analíticos obtenidos con patrones de control preparados independientemente. La precisión depende de la concentración y debe medirse con concentraciones diferentes dentro del rango aceptado, normalmente en la parte baja, media y alta de éste. Una precisión aceptable en el nivel inferior de concentración es del 20%. Con concentraciones más altas la precisión debe ser mayor. En algunos casos estos criterios de aceptación pueden suavizarse, por ejemplo, en los análisis de muestras de autopsias, en los que los efectos de matriz pueden ser importantes.⁴²

3.15.4 Exactitud (sesgo)

Medición de la diferencia entre los resultados previstos del análisis y el valor de referencia aceptado, debido a un error sistemático del método y del laboratorio. Normalmente se expresa en porcentaje. La exactitud y la precisión determinan el error total del análisis. La exactitud se determina teóricamente utilizando material de referencia certificado (MRC) si es posible, métodos de referencia, estudios en colaboración o mediante comparación con otros métodos.⁴³

3.15.5 Estabilidad

Para validar un método debe demostrarse en qué medida los analitos se mantienen estables durante todo el procedimiento de análisis, incluido su almacenamiento antes y después de éste. En general, la medición se hace comparando patrones recién preparados con una concentración conocida con patrones similares almacenados durante diferentes períodos de tiempo y en diferentes condiciones.⁴²

3.15.6 Límite de cuantificación o determinación

El menor contenido mensurable que permite cuantificar el analito con un grado razonable de exactitud y precisión. En algunos laboratorios, el límite inferior de cuantificación se considera equivalente a la concentración mínima de calibración del rango de trabajo, ya que la exactitud y precisión de esta concentración se verifica en todos los lotes/tandas de análisis.⁴²

Se designa límite inferior de cuantificación de la curva de calibración, a la concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud, determinada en función de las necesidades de cuantificación del estudio.⁴²

3.15.7 Robustez

La robustez de un procedimiento analítico mide su capacidad para no verse afectado por pequeñas variaciones deliberadas de los parámetros del método y sirve de indicio de su fiabilidad en su uso normal.⁴²

3.15.8 Tolerancia

Capacidad de un proceso de medición para soportar pequeñas variaciones incontroladas o involuntarias en sus condiciones de funcionamiento.⁴²

4. Planteamiento del problema

Uno de los aspectos más importantes a determinar en los laboratorios de investigación es la citotoxicidad de los compuestos en estudio y la cuantificación de la enzima citosólica LDH es una buena forma de evaluarla cuando se trabaja con cultivos celulares in vitro.

La enzima se cuantifica mediante una reacción de reducción de sal de tetrazolium la cual produce un compuesto colorido llamado formazan. En este ensayo, el número de células lisadas o dañadas es directamente proporcional a la cantidad de LDH y a su vez la cantidad de LDH es directamente proporcional a la intensidad de la coloración medida por espectrofotometría.

En el mercado existen estuches que contienen las sustancias necesarias para llevar a cabo este análisis, sin embargo el costo de estos es elevado. De ahí la importancia de proponer y estandarizar un método que contenga los reactivos y concentraciones adecuadas para que pueda efectuarse en el laboratorio y que permita la optimización de tiempo y costos.

5. Hipótesis

La LDH es en una enzima citosólica importante en el metabolismo y homeostasis celular, si la membrana celular se daña severamente, la LDH será liberada al medio extracelular; por lo que se implementará y estandarizará un método colorimétrico que permita su determinación en sobrenadantes de medios de cultivos celulares, como marcador de daño y muerte celular.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general.

Establecer las condiciones experimentales para cuantificar la enzima deshidrogenasa láctica (LDH) en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer de la planta baja de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza.

6.2 Objetivos particulares

- Establecer la concentración necesaria de reactivos para que la reacción enzimática se lleve a cabo.
- Establecer las condiciones óptimas para el método.
- Determinar cuáles son las condiciones apropiadas para almacenar los reactivos ocupados, sin afectar su utilidad.
- Establecer el tiempo que tarda en realizarse el ensayo.
- Adaptar la técnica para que pueda cuantificar inequívocamente la cantidad de LDH equivalente a aproximadamente 15000 células de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo de cáncer de cérvix.
- Determinar el límite de cuantificación del método.
- Determinar si la técnica es lineal, precisa, repetible, reproducible, robusta, tolerante y selectiva.
- Realizar cultivos de células de cáncer cervico-uterino.

7. Material y métodos

Diseño experimental

Tipo de estudio: Experimental, prolectivo y longitudinal.

Población de estudio: LDH liberado al medio de cultivo.

Criterio de inclusión: Cultivos de células no contaminados.

Criterio de exclusión: Cultivos de células contaminados.

Variables de control: Concentración de células, concentración de reactantes, línea celular.

Variables de respuesta: Cantidad de LDH liberado al medio.

Análisis estadístico: correlación de Pearson.

Material

- Pipetas
- Micropipetas
- Puntas para pipetas
- Placa de 96 pozos
- Cajas Petri
- Gradilla
- Frascos ámbar.
- Reservorios
- Tubos Eppendorf

Equipo

- Balanza granataria
- Balanza analítica
- Centrifuga
- Espectrofotómetro
- Microscopio de contraste de fases
- Incubadora

Material Biológico

- Células de cáncer cérvico-uterino de las líneas celulares: Hela, Caski y ViBo.

7.1 Reactivos

- 1) Solución de β -Nicotinamida adenina dinucleotido (NAD^+) SIGMA-ALDRICH[®]
- 2) Solución de cloruro de iodonitrotetrazolium (INT) SIGMA-ALDRICH[®]
- 3) Solución de metosulfato de fenazina (PMS) SIGMA-ALDRICH[®]
- 4) Lactato de sodio SIGMA-ALDRICH[®]
- 5) Buffer TRIS (hidroximetilaminometano). SIGMA-ALDRICH[®]
- 6) Solución de paro: Ácido acético. Reactivos Química Meyer
- 7) Solución de lisis. Tritón 100x SIGMA-ALDRICH[®]

Preparación de reactivos para una placa de 96 pozos:

1.-Solución de β -Nicotinamida adenina dinucleotido (NAD^+)

Pesar 2.4mg de NAD^+ y agregar 1mL de agua destilada, agitar hasta solubilizar por completo el compuesto.

2.-Solución de cloruro de iodonitrotetrazolium (INT)

Pesar 1.8mg de INT y agregar 1mL de agua destilada, agitar hasta solubilizar por completo el compuesto

3.-Solución de metosulfato de fenazina (PMS)

Pesar 1.2mg de PMS y agregar 1mL de agua destilada, agitar hasta solubilizar por completo el compuesto (cuando esta solución es almacenada en la oscuridad de 4-6°C es estable por varias semanas y su descomposición es fácilmente reconocible por el cambio de color de amarillo a verde).

4.- Buffer TRIS (hidroximetilaminometano) 0.5M pH=8

Pesar 363.4mg de buffer TRIS y agregar 6mL de agua destilada, agitar hasta solubilizar por completo el compuesto. Ajustar el pH a 8.0 con ácido clorhídrico concentrado 37% (aproximadamente cuatro gotas) e hidróxido de sodio 5M según sea el caso.

5.- Solución de lactato de sodio

Pesar 16.6mg de lactato de sodio disolver en 0.2mL de agua destilada, agitar hasta solubilizar por completo el compuesto y agregar 2.3mL de buffer TRIS 0.5M pH=8.

6.-Solución de paro

Preparar 100mL de ácido acético 1M.

7.-Solución de lisis

Preparar 100mL de Tritón 100X al 9%

8. Metodología

Se realizó una investigación bibliográfica detallada en varias revistas especializadas^{38,39,40,44 y 45} en donde se utilizaron diferentes metodologías para obtener la mezcla de reacción, se calcularon las concentraciones milimolares de

cada reactivo en la mezcla de reacción para cada caso, se analizaron y se obtuvo un método con algunas modificaciones de acuerdo con los reactivos disponibles.

Lisis celular y recuperación del sobrenadante

- 1.-Adicionar 10 μ L de solución de lisis por cada 100 μ L de medio a cada pozo de control positivo (100% de liberación de LDH).
- 2.-Dejar durante una hora en una incubadora humidificada a 37°C y 5% de CO₂.
- 3.-Centrifugar la placa a 1500r.p.m. durante 5 minutos.

Medición de la LDH

- 4.-Transferir alícuotas de 50 μ L de todos los pozos a una placa de 96 pozos nueva o perfectamente limpia.
- 5.-Preparar la mezcla de sustratos procurando proteger a los reactivos de la luz directa:

Adicionar las soluciones de INT, de NAD⁺ y de lactato de sodio a un mismo contenedor y agitar en vortex durante un minuto, al final se adiciona la solución de PMS, agitar nuevamente la mezcla de sustratos en vortex durante un minuto.

NOTA: Proteger la mezcla de sustratos de la luz.

- 6.-Agregar 50 μ L de la mezcla de sustratos a cada pozo de la placa. Cubrir la placa y guardar por 25 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz.
- 7.-Agregar 50 μ L de solución de paro a cada pozo.
- 8.-Romper cualquier burbuja (si es que se ha formado) en los pozos con ayuda de una aguja y medir la absorbancia a 492nm sin dejar pasar más de una hora a partir de la adición de la solución de paro.

Preparación de células

Cultivo de células tumorales

Se mantuvieron cultivos celulares de cáncer cérvico-uterino de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo en cajas Petri de cristal de 10cm, con 10mL de medio RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) y 5% de suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum SIGMA-ALDRICH®) desactivado a 56°C por 30 minutos. Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora (Nuair US Autoflow), los cultivos se sembraron cuando el crecimiento en la caja de Petri llegó a un 60-70% de saturación para mantener a las células libres de estrés.

8.1 Validación del sistema

Se elaboró una curva de calibración con LDH estándar obtenida del estuche comercial Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay en donde la información proporcionada por el proveedor una dilución 1:5000 contiene aproximadamente la cantidad de enzima liberada por 13500 fibroblastos L929 lisados,⁴⁴ se realizaron las diluciones para obtener teóricamente cinco niveles de concentración (13500, 10075, 6650, 3425, y 200 fibroblastos L929 lisados) a partir de una misma solución patrón de LDH estándar y una muestra blanco (PBS al 5% de albumina bovina). Se determinó la concentración de LDH en las muestras utilizando la mezcla de sustratos Cyto Tox 96® y con la mezcla de sustratos propuesta por ocho repeticiones de cada condición, en una placa de 96 pozos. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con una prueba de correlación de Pearson.

8.2 Linealidad del sistema

Se elaboró una curva de calibración con LDH estándar obtenida del estuche comercial Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay en donde según la información proporcionada una dilución 1:5000 contiene aproximadamente la cantidad de enzima liberada por 13500 fibroblastos L929 lisados,⁴⁴ se realizaron las diluciones para obtener teóricamente cinco niveles de concentración (13500, 10075, 6650, 3425, y 200 fibroblastos L929 lisados) a partir de una misma

solución patrón de LDH estándar y una muestra blanco (PBS al 5% de albumina bovina). Se determinó la concentración de LDH en las muestras utilizando la mezcla de sustratos propuesta por ocho repeticiones de cada condición, en una placa de 96 pozos.

8.3 Precisión del sistema

Los valores para precisión del sistema fueron tomados del ensayo de linealidad del sistema ya que se recomiendan mínimo 6 ensayos con alícuotas de una muestra homogénea (solución estándar al 100%).

8.4 Validación del método

Para la validación del método se utilizaron células CasKi. (Ver validación del sistema)

8.5 Linealidad del método

Se elaboró una curva a concentraciones celulares crecientes, sembrando células CaSki en una placa de 96 pozos con medio RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) y 5% de suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum SIGMA-ALDRICH®) desactivado a 56°C por 30 minutos. Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora (Nuair US Autoflow), después de 24 horas se lisaron las células con tritón 100x y se determinó la LDH con el método propuesto. Se utilizaron cinco niveles de concentración celular representando el 80%, 90%, 100%, 110% y 120% de células. Partiendo de la premisa que después de 24 horas de incubación las células se habrán adherido y multiplicado, por lo tanto 15000 células pasadas 24 horas equivaldrán al 100% de la cantidad de LDH liberado.

8.6 Precisión

Se sembraron 15000 células CasKi, con ocho repeticiones una placa de 96 pozos con medio RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y

bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) y 5% de suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum SIGMA-ALDRICH®) desactivado a 56°C por 30 minutos. Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora (Nuair US Autoflow), después de 24 horas se lisaron las células con tritón 100x y se determinó la LDH intracelular con el método propuesto.

8.7 Repetitividad

El mismo analista en dos días diferentes, preparo la mezcla de sustratos para la determinación de LDH y sembró 15000 células CasKi, con 8 repeticiones en una placa de 96 pozos con medio RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) y 5% de suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum SIGMA-ALDRICH®) desactivado a 56°C por 30 minutos. Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora (Nuair US Autoflow), después de 24 horas el mismo analista liso las células con tritón 100x y determinó la LDH intracelular con el método propuesto.

8.8 Reproducibilidad

Un analista diferente al que realizo la estandarización del método preparo la mezcla de sustratos para la determinación de LDH y sembró 15000 células CasKi, con 8 repeticiones en una placa de 96 pozos con medio RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) y 5% de suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum SIGMA-ALDRICH®) desactivado a 56°C por 30 minutos. Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora (Nuair US Autoflow), después de 24 horas el mismo analista liso las células con tritón 100x y determinó la LDH intracelular con el método propuesto, los datos obtenidos se compararan con los datos de otro ensayo realizado por el analista que estandarizó el método.

8.9 Robustez

Se sembraron 15000 células CasKi, con ocho repeticiones, en una placa de 96 pozos con medio RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) y 5% de suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum SIGMA-ALDRICH®) desactivado a 56°C por 30 minutos. Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora (Nuair US Autoflow), después de 24 horas se lisaron las células con tritón 100x y se determinó la LDH intracelular con el método propuesto, pero omitiendo el paso en donde se agrega la solución de paro y se realizaron las lecturas de absorbancia en el tiempo establecido por el método, cinco minutos antes y cinco minutos después.

8.10 Tolerancia

Se sembraron 15000 células Hela, CasKi y ViBo, con ocho repeticiones, en una placa de 96 pozos con medio RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) y 5% de suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum SIGMA-ALDRICH®) desactivado a 56°C por 30 minutos. Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora (Nuair US Autoflow), después de 24 horas se lisaron las células con tritón 100x y se determinó la LDH intracelular con el método propuesto, comparando las absorbancias entre cada línea celular.

8.11 Estabilidad de la muestra

Se sembraron 15000 células CasKi, con ocho repeticiones, en una placa de 96 pozos con medio RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) y 5% de suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum SIGMA-ALDRICH®) desactivado a 56°C por 30 minutos. Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora (Nuair US Autoflow), después de 24 horas se lisaron las células con tritón 100x y se recolectaron los sobrenadantes, se almacenaron en

refrigeración y congelamiento por 24 y 48 horas, determinando la LDH intracelular con el método propuesto en cada lapso de tiempo, los resultados obtenidos se compararon con los de una muestra recién preparada.

8.12 Estabilidad de la mezcla de sustratos

Se preparó una solución de LDH estándar obtenida del estuche comercial Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay equivalente a la cantidad de enzima liberada por 13500 fibroblastos L929 lisados, para lo cual se disolvió un 1µL de la solución estándar en 5mL de PBS al 1% de albumina de suero bovino (BSA). Simultáneamente se preparó la mezcla de sustratos y se realizó una determinación de absorbancias con los reactivos en fresco y se almacenó la mezcla de sustratos en refrigeración para volver a ser analizada con solución patrón de LDH a los cuatro días.

8.13 Estabilidad de las soluciones individuales

Se preparó una solución de LDH estándar obtenida del estuche comercial Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay equivalente a la cantidad de enzima liberada por 13500 fibroblastos L929 lisados, para lo cual se disolvió un 1µL de la solución estándar en 5mL de PBS al 1% de albumina de suero bovino (BSA). Simultáneamente, se prepararon las soluciones para la mezcla de sustratos (Lactato de sodio, NAD⁺, PMS e INT), se realizó una determinación de absorbancias con los reactivos en fresco y se almacenaron las soluciones en congelamiento, para volver a ser analizados con solución patrón de LDH a los 8 días.

8.14 Límite de detección y límite de cuantificación

Se elaboró una curva a concentraciones celulares crecientes, sembrando células CasKi, con ocho repeticiones en una placa de 96 pozos con medio RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) y 5% de suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum SIGMA-ALDRICH®) desactivado a 56°C por 30 minutos. Los cultivos se incubaron a 37°C,

5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora (Nuair US Autoflow), después de 24 horas se lisaron las células con tritón 100x y se determinó la LDH intracelular con el método propuesto. Se utilizaron cinco niveles de concentración: 100, 200, 600, 1800 y 5400 células. Estas concentraciones se establecieron a partir de los resultados observados en las determinaciones experimentales de linealidad del método con respecto a la respuesta del blanco.

8.15 Selectividad

Se llevó a cabo un estudio de citotoxicidad mediante la cuantificación de LDH usando el método propuesto, utilizando como agente citotóxico resina de podofilina al 25% (LABORATORIOS BUSTILLOS, S.A. de C.V.), el cual es un extracto comercial del podofilino emodi o podofilino indio (*Podophyllum emodi* Wall. ó *Podophyllum hexandrum* Royle); Un queratolítico indicado en el tratamiento tópico de tumores epiteliales benignos tales como fibrosis y papilomas, también para el tratamiento tópico del condiloma acuminado, verrugas genitales y perianales. Su acción se debe a la podofilotoxina, principio activo del podofilino, que es citotóxico y actúa inhibiendo la mitosis celular en metafase.

Se elaboró una curva de concentración por diluciones seriadas a partir de esta solución comercial obteniendo concentraciones de 250µg/mL, 125 µg/mL, 62.5µg/mL, 31.25µg/mL y 15.63µg/mL, se realizó y analizó cada condición por quintuplicado en una placa de 96 pozos sobre cultivos con 15000 células CasKi.

9. Resultados:

9.1 Validación Sistema

Prueba de Pearson relación entre los datos de absorbancia obtenidos con la mezcla de sustratos propuesta (eje Y) y con el estuche comercial (eje X).

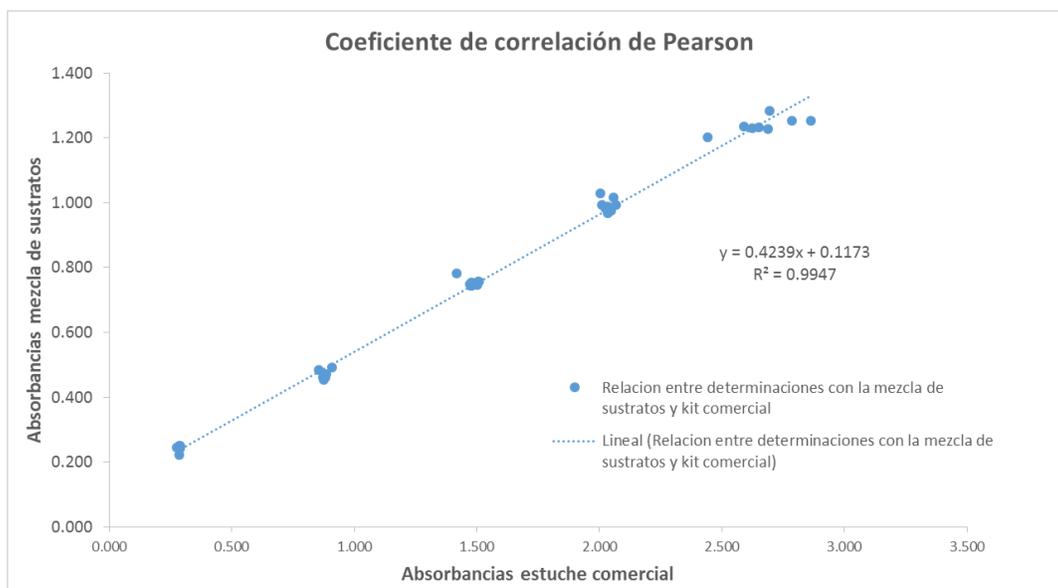


Figura 8. Validación del sistema. Correlación entre los datos obtenidos al analizar las mismas muestras de LDH estándar con el estuche comercial y con la mezcla de sustratos propuesta, por ocho repeticiones de cada condición.

9.1.1 Linealidad del sistema

Los datos en los valores de absorbancia obtenidos por una dilución seriada de la muestra estándar de LDH correspondientes en teoría a 200, 3325, 6650, 9975 y 13500 fibroblastos L929 lisados para obtener así cinco puntos necesarios que permitieran observar la linealidad del sistema mostraron ser lineales, tanto para el estuche comercial como para la mezcla de sustratos propuesta, lo cual se puede observar claramente en su coeficiente de correlación lineal R^2 el cual fue de 0.9996 y 0.9988 respectivamente.

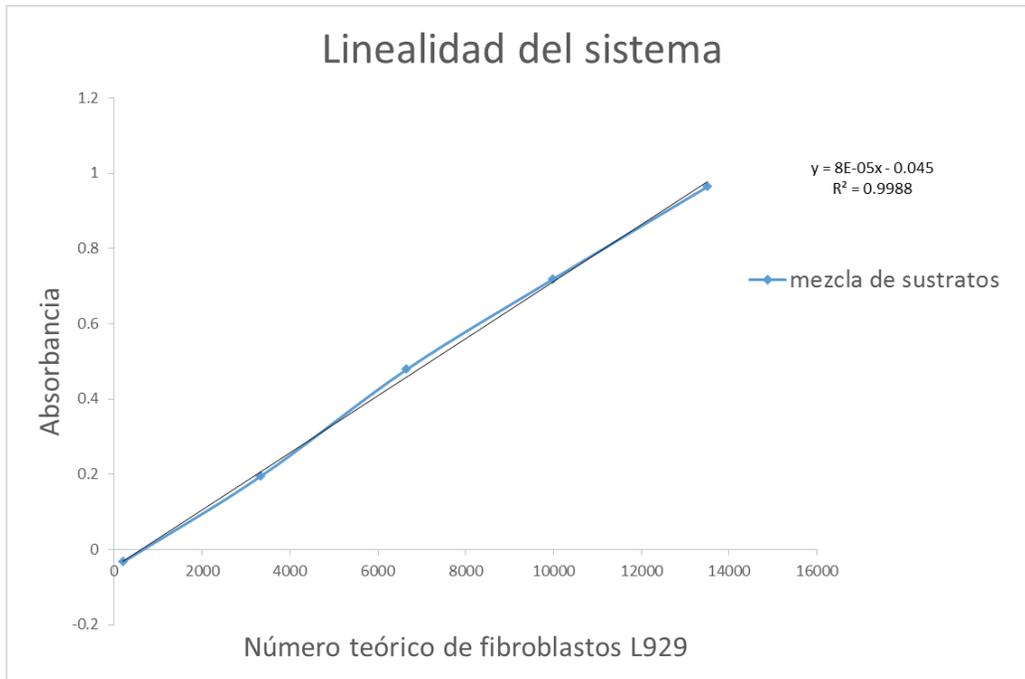


Figura 9. Análisis de la linealidad del sistema. Datos obtenidos al analizar las muestras de LDH estándar del estuche comercial con la mezcla de sustratos propuesta, por ocho repeticiones de cada condición.

9.1.2 Precisión del sistema

Al analizar los datos se obtuvo un promedio de 1.240 en el valor de absorbancia que correspondería en teoría a 13500 fibroblastos L929 lisados con una desviación estándar de 0.025.

Mezcla de sustratos	
	13500 células
	1.285
	1.254
	1.233
	1.235
	1.230
	1.201
	1.228
	1.254
Promedio	1.240
Desviación estándar	0.025

Tabla 2. Datos tomados del ensayo de linealidad del sistema. Promedio: 1.240 ± 0.025 .

9.2 Validación Método

9.2.1 Linealidad del Método

Los datos en los valores de absorbancia obtenidos de lisados de cultivos con 12000, 13500, 15000, 16500 y 18000 células CasKi, cuando se utilizó la mezcla de sustratos propuesta, representan cinco puntos necesarios para observar la linealidad del método. Los datos son lineales, lo cual se puede observar claramente en el coeficiente de correlación lineal R^2 , el cual fue de 0.9807 que es bastante bueno considerando que se trata de una matriz biológica, en donde el valor de R^2 suele ser menor.

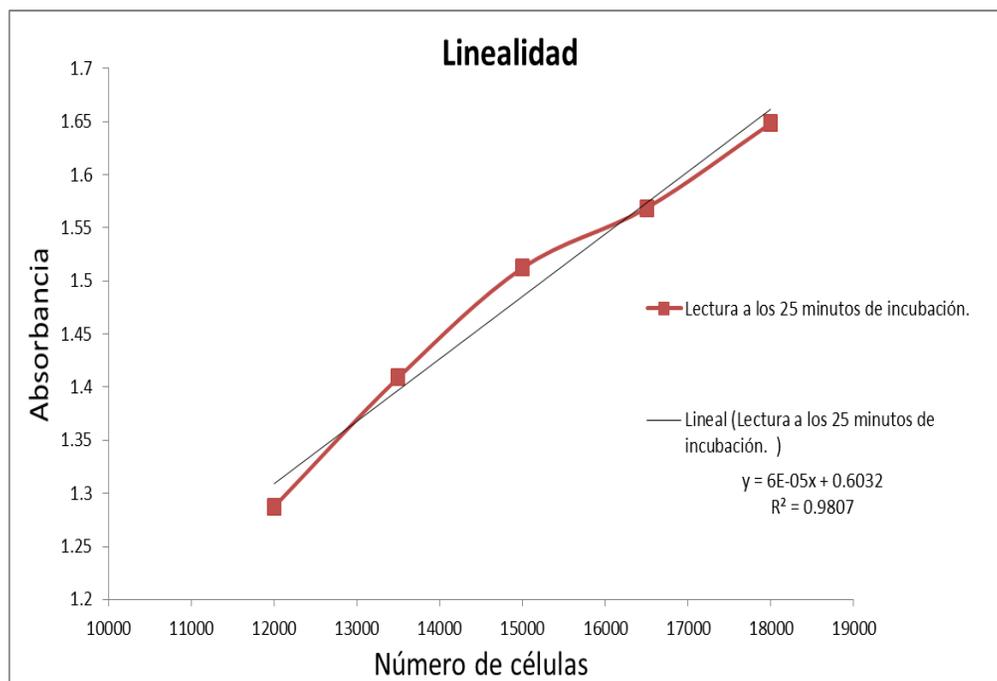


Figura 10. Determinación de la linealidad del método. Absorbancias obtenidas de cultivos de células CasKi con 12000 (80%), 13500 (90%), 15000 (100%), 16500 (110%) y 18000 (120%) en ocho repeticiones de cada condición.

9.2.2 Precisión

Al analizar los datos se obtuvo un promedio de 1.930 en el valor de absorbancia que correspondería aproximadamente a 15000 células CasKi lisadas con una desviación estándar de 0.081.

Mezcla de sustratos	
	15000 células
	2.026
	1.876
	1.892
	1.893
	1.832
	1.911
	1.939
	2.073
Promedio	1.930
Desviación estándar	0.081

Tabla 3. Absorbancias obtenidas de lisados de células CasKi en ocho repeticiones. Promedio: 1.930 ± 0.081

9.2.3 Repetitividad

Al analizar los datos obtenidos al recuperar el sobrenadante de aproximadamente 15000 células CasKi en dos días diferentes por el mismo analista con el mismo equipo, el mismo material y los mismos reactivos, se obtuvieron las condiciones de repetitividad.

Mezcla de sustratos		Mezcla de sustratos			
	15000 células		15000 células		
	2.058		2.026		
	1.893		1.900		
	1.882		1.913		
	1.907		1.919		
	1.879		1.915		
	1.906		1.975		
	1.851		1.985		
	1.958		2.025		
	Promedio		1.917	Promedio	1.957
	Desviación estándar		0.065	Desviación estándar	0.052

Tabla 4. Absorbancias obtenidas de lisados de células CasKi en ocho repeticiones el 30 de noviembre de 2015.

Tabla 5. Absorbancias obtenidas de lisados de células CasKi por el mismo analista en ocho repeticiones el 3 de diciembre de 2015.

9.2.4 Reproducibilidad

Al analizar los datos obtenidos al recuperar el sobrenadante de aproximadamente 15000 células CasKi en dos días diferentes (cada día el ensayo se realizó por analistas diferentes) con el mismo equipo, el mismo material y los mismos reactivos, se obtuvieron las condiciones de reproducibilidad.

Mezcla de sustratos		Mezcla de sustratos	
	15000 células		15000 células
	2.077		1.673
	1.865		1.619
	1.888		1.545
	1.936		1.519
	1.921		1.528
	1.846		1.573
	1.849		1.599
	2.013		1.571
Promedio	1.924	Promedio	1.578
Desviación estándar	0.083	Desviación estándar	0.051

Tabla 6. Absorbancias obtenidas de lisados de células CasKi en ocho repeticiones por el analista que estandarizó el método.

Tabla 7. Absorbancias obtenidas de lisados de células CasKi en ocho repeticiones por un analista diferente al que estandarizó el método.

9.2.5 Robustez

Al analizar los datos obtenidos de las lecturas de absorbancia a 492nm a los 20, 25 y 30 minutos de incubación se observa que los valores de absorbancia son dependientes del tiempo ya que aumentan cuando aumenta el tiempo de incubación tomando como 100% la condición en donde se incubó por 25 minutos, a los 20 minutos se observa un 15.12% menos de absorbancia y a los 30 minutos un 6.72% más.

Mezcla de sustratos			
	15000 células		
	20 minutos	25 minutos	30 minutos
	1.607	1.879	2.005
	1.588	1.868	1.987
	1.630	1.923	2.053
	1.654	1.969	2.094
	1.619	1.914	2.044
	1.643	1.967	2.081
	1.641	1.921	2.061
	1.639	1.905	2.055
Promedio	1.628	1.918	2.047
Desviación estándar	0.022	0.036	0.036

Tabla 8. Absorbancias obtenidas de lisados de células CasKi en ocho repeticiones omitiendo la adición de solución de paro y realizando lecturas de absorbancia a 492nm a los 20, 25 y 30 minutos de incubación.

9.2.6 Tolerancia

Al analizar las absorbancias obtenidas de sobrenadantes de cultivos con 15000 células CasKi, ViBo y HeLa (1.918, 1.959 y 2.336 respectivamente) con el método propuesto, se observa que el método es tolerante ya que funciona de manera adecuada cuando se cambian las líneas celulares con las que se trabaja.

Mezcla de sustratos			
	15000 células		
	CasKi	ViBo	HeLa
	1.879	1.978	2.363
	1.868	1.918	2.341
	1.923	1.923	2.312
	1.969	2.152	2.363
	1.914	1.927	2.211
	1.967	1.885	2.376
	1.921	1.934	2.374
	1.905	1.951	2.350
Promedio	1.918	1.959	2.336
Desviación estándar	0.036	0.082	0.055

Tabla 9. Absorbancias obtenidas de lisados de células CasKi, ViBo y HeLa en ocho repeticiones de cada línea celular.

9.2.7 Estabilidad de la muestra

Las absorbancias obtenidas de sobrenadantes frescos de cultivos con 15000 células CasKi tratadas con tritón 100x comparadas con las mismas muestras congeladas durante 24.85 y 49 horas, muestran que la actividad enzimática en los sobrenadantes almacenados por congelación decae de manera rápida.

Mezcla de sustratos		
	15000 células	
	Muestra fresca	Muestra 24.85 horas
	2.129	1.161
	1.904	1.143
	1.914	1.154
	1.915	1.160
	1.914	1.181
	1.924	1.185
	1.917	1.163
	2.013	1.164
Promedio	1.954	1.164
Desviación estándar	0.079	0.014

Tabla 10. Absorbancias obtenidas de lisados de células CasKi en ocho repeticiones de muestras frescas y ocho repeticiones de las mismas muestras congeladas durante 24.85 horas.

Mezcla de sustratos		
	15000 células	
	Muestra fresca	Muestra 49 horas
	2.077	0.723
	1.865	0.793
	1.888	0.770
	1.936	0.787
	1.921	0.791
	1.846	0.740
	1.849	0.679
	2.013	
Promedio	1.924	0.755
Desviación estándar	0.083	0.043

Tabla 11. Absorbancias obtenidas de lisados de células CasKi en ocho repeticiones de muestras frescas y siete repeticiones de las mismas muestras congeladas durante 49 horas.

9.2.8 Estabilidad de la mezcla de sustratos

Absorbancias obtenidas de la solución patrón de LDH que equivale a la LDH liberada por 13500 fibroblastos L929 lisados en ocho repeticiones, evaluada con una mezcla de sustratos fresca y con la misma mezcla almacenada en refrigeración y protegida de la luz durante 92.2 horas.

Mezcla de sustratos		
	LDH estándar	
	Mezcla fresca	Mezcla a las 92.2 horas
	0.705	0.622
	0.699	0.629
	0.713	0.634
	0.723	0.636
	0.720	0.632
	0.714	0.631
	0.714	0.680
	0.706	0.643
Promedio	0.712	0.638
Desviación estándar	0.008	0.018

Tabla 12. Absorbancias de una muestra fresca y otra almacenada en refrigeración y protegida de la luz durante 92.2 horas.

9.2.9 Estabilidad de las soluciones individuales

Absorbancias obtenidas de la solución patrón de LDH que equivale a la LDH liberada por 13500 fibroblastos L929 lisados en ocho repeticiones, evaluada con una mezcla de sustratos elaborada con soluciones recién preparados y con soluciones almacenadas en congelación (-20°C) y protegidos de la luz durante 190.62 horas.

Mezcla de sustratos		
	LDH estándar	
	Soluciones frescas	Soluciones a las 190.62
	0.705	0.660
	0.699	0.683
	0.713	0.664
	0.723	0.653
	0.720	0.676
	0.714	0.672
	0.714	0.683
	0.706	0.670
Promedio	0.712	0.670
Desviación estándar	0.008	0.011

Tabla 13. Absorbancias obtenidas con una mezcla de sustratos recién preparada y con una mezcla elaborada con soluciones almacenadas durante 190.62 horas.

9.2.10 Límite de detección y límite de cuantificación

Los datos en los valores de absorbancia obtenidos de lisados de cultivos con 100, 200, 600, 1800 y 5400 células CasKi cuando se utilizó la mezcla de sustratos propuesta, obteniendo así cinco puntos bajos necesarios para observar el límite de detección y el límite de cuantificación, demostraron que ser lineales, lo cual se puede observar claramente en el coeficiente de correlación lineal R^2 el cual fue de 0.995 que nos indica que ambos límites se pueden estimar de manera confiable.

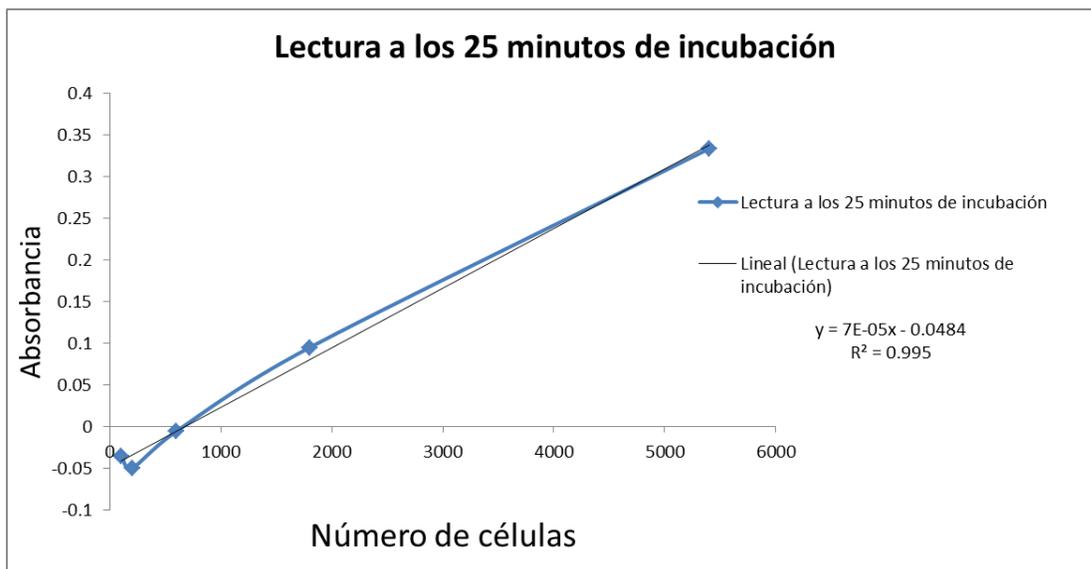


Figura 11. Determinación del límite de detección y de cuantificación de la LDH en lisados de células CasKi. Absorbancias obtenidas de cultivos con 100 (0.67%), 200 (1.33%), 600 (4.00%), 1800 (12.00%) y 5400 células (36.00%) en ocho repeticiones de cada condición.

9.2.11 Selectividad

Las absorbancias obtenidas en el ensayo demuestran que el método es selectivo ya que a pesar de haber usado un extracto comercial como agente citotóxico, el cual tiene múltiples componentes originarios de la planta *Podophyllum sp*, estos no interfieren en la reacción estudiada

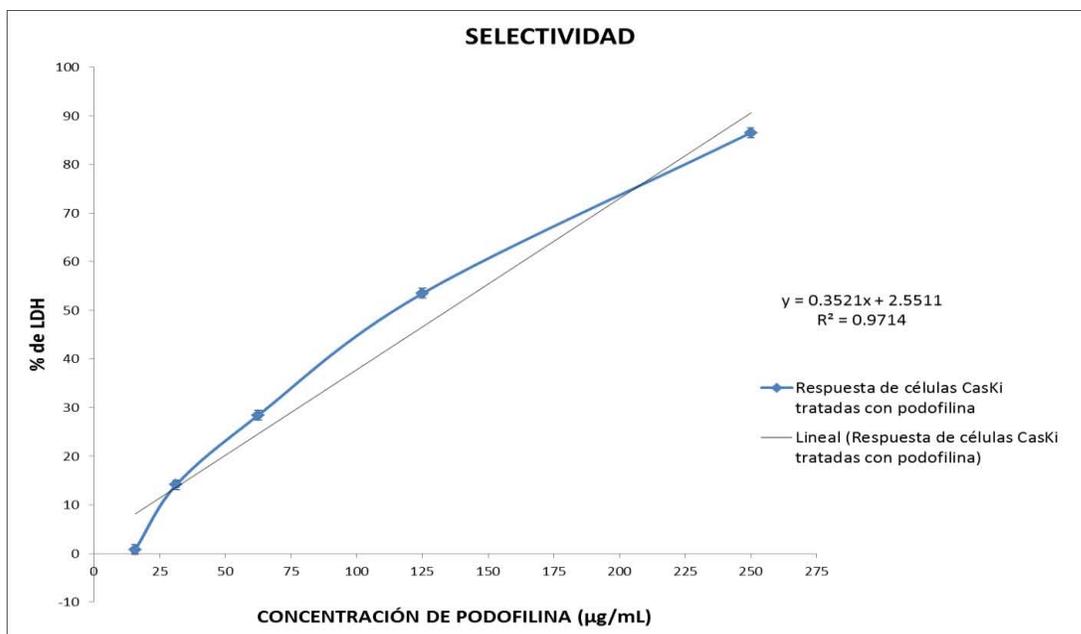


Figura 12. Determinación de la selectividad. Absorbancias obtenidas de cultivos con 15000 células CasKi en una placa de 96 pozos, 24 horas después de haber sido estimuladas con resina de podofilina a concentraciones de 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 62.5 $\mu\text{g/mL}$, 31.25 $\mu\text{g/mL}$ y 15.63 $\mu\text{g/mL}$, en ocho repeticiones de cada condición.

10. Discusión

10.1 Validación del sistema.

El sistema es **lineal**, ambas mezclas muestran la capacidad de detectar una relación directamente proporcional entre la absorbancia a 492nm y la cantidad de LDH en las muestras, solo que la mezcla del estuche comercial tiene una mayor pendiente que la mezcla de sustratos propuesta y por lo tanto una mayor sensibilidad (0.0002 y 0.00008 respectivamente). Sin embargo, la mezcla de sustratos propuesta es adecuada para los ensayos que se llevan a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer de la planta baja de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza.

No se pudo establecer una **exactitud** pues los valores no se consiguen comparar con valores teóricos reportados en la literatura, ya que al ser un producto biológico la concentración de la muestra de LDH estándar varía entre cada casa comercial proveedora del estuche. Esto puede deberse a la metodología que cada una utiliza para su extracción e inclusive hay una variación entre cada lote de producción, además la LDH estándar no proviene de las mismas líneas celulares con las que se estandarizó este método. Sin embargo, se puede observar una buena concordancia entre los valores obtenidos de cada repetición con una desviación estándar muy pequeña de 0.025 lo cual indicó que el sistema tiene una buena **precisión** y cumple con los criterios de aceptación.

10.2 Validación del Método

El método es válido ya que se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.9947; muy cercano a 1 (ver figura 8), al comparar el estuche comercial con la mezcla de sustratos propuesta.

Cuando se determina la **linealidad** (ver Figura 10) los datos obtenidos con la mezcla de sustratos propuesta, muestran la capacidad de detectar una relación directamente proporcional entre la absorbancia a 492nm y la cantidad de LDH en las muestras, con una buena pendiente 0.00006 y por lo tanto una sensibilidad

adecuada para su uso en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza.

Los valores de absorbancia no se pueden comparar con valores teóricos reportados en la literatura debido a varios factores, entre ellos, las líneas celulares con las que se trabaja. Además, al realizar el conteo de células para su cultivo, este se realiza en una cámara de Neubauer en donde inherentemente se presentan errores debido a la subjetividad del analista a la hora del conteo, ya que no todos los analistas cuentan los cuadrantes de la misma manera. Sin embargo, este método de conteo es el más utilizado en el ámbito de la investigación, es por eso que generalmente los resultados del ensayo de LDH se reportan en porcentaje tomando como 100% a un cultivo al cual no se le aplica el tratamiento y únicamente se lisa con detergente. Por lo tanto, no podemos hablar de un grado de **exactitud**, sin embargo, se observa una buena concordancia entre los valores obtenidos de cada repetición con una desviación estándar muy pequeña de 0.081 lo cual indica que el método tiene una buena **precisión**.

En condiciones de **repetitividad** se observa que los criterios se cumplen, al haber una variación mínima en el promedio de las lecturas de absorbancia entre ambos días en los que se realizó el ensayo. Para el primer día se obtuvo un promedio de 1.917 y en el segundo 1.886, con una variación de 0.031 entre ambos promedios, esta variación es mínima e inherente a las condiciones en las que se trabaja en el laboratorio.

En condiciones de **reproducibilidad** se observa que los criterios se cumplen al haber una pequeña variación en el promedio de las lecturas de absorbancia entre ambos días en los que se realizó el ensayo. Para el primer día se obtuvo un promedio de 1.924 y en el segundo 1.578, con una variación de 0.346 entre ambos valores, esta variación es baja y se justifica por el uso de la cámara de Neubaer para el conteo celular en donde puede haber diferencias significativas entre cada analista.

El ensayo es **robusto** pues aunque hay variaciones en el tiempo de incubación que afectan considerablemente los valores de absorbancia, el aumento es proporcional en todos los puntos de la recta como se puede observar en la figura 13 tomada de uno de los ensayos para estandarizar el método, conservando así, una relación entre los puntos a evaluar con este método sin que se afecten por ligeras variaciones en el tiempo de incubación.

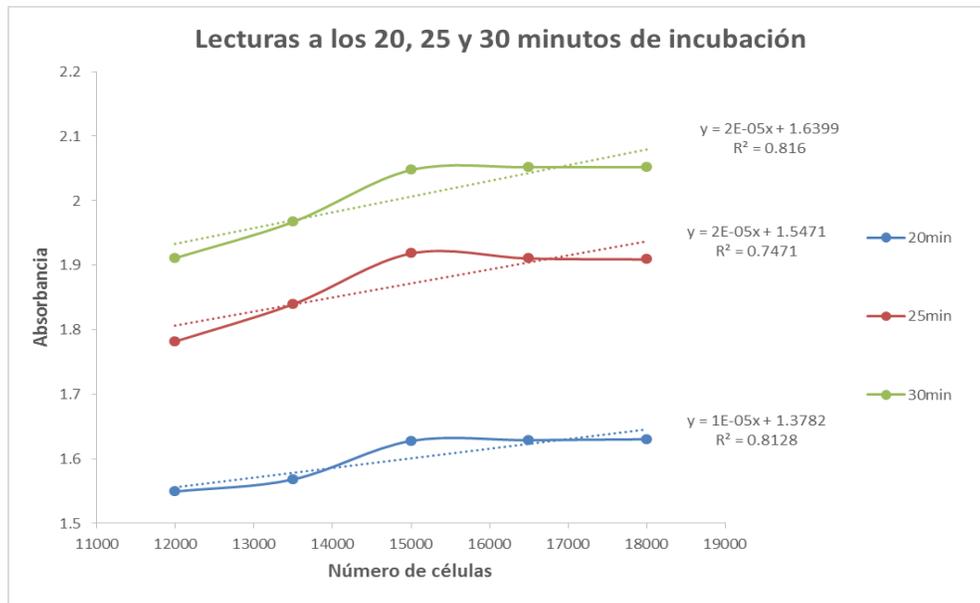


Figura 13. Determinación de robustez a diferentes tiempos de incubación. Curva con cinco puntos a los 20, 25 y 30 minutos de incubación con lisados de células CasKi utilizando el método propuesto.

Las diferencias entre las absorbancias obtenidas para cada línea celular (CasKi, ViBo y HeLa) son debidas a la naturaleza de cada una, pues aunque todas son líneas de cáncer cervicouterino tienen variaciones en tamaño, metabolismo y tasa de crecimiento, además de la variación en el conteo del número celular, sin embargo, los valores son parecidos entre sí, por lo tanto el método es **tolerante**.

Cuando se analizó la **estabilidad de la muestra**, a las 24.85 horas de almacenamiento la actividad decae en un 39.24% reflejándose en una lectura de absorbancia de 1.954 a 1.164 y para las 49 horas de congelación en una muestra diferente pasa de 1.924 a 0.755 decayendo la actividad enzimática en un 59.57%. Lo cual concuerda con el tiempo de vida media calculado de 33.26 horas, es decir cada 33 horas con 15 minutos la absorbancia de la muestra se reducirá a la mitad.

Demostrándose así que las muestras no soportan el almacenamiento, esto es debido a que al almacenarse en congelamiento las proteínas modifican su estructura cuaternaria la cual no se recupera completamente al descongelarse, las mismas proteasas provenientes de las células en cultivo y el detergente con las cuales se tratan estas células son otros de los factores que disminuyen la actividad enzimática de la LDH contenida en los sobrenadantes recuperados, disminuyendo de igual manera la sensibilidad del método, por lo cual se sugiere que las determinaciones de LDH se realicen el mismo día que se recuperan los sobrenadantes para el ensayo.

Para la **estabilidad de la mezcla de sustratos**, al analizar las absorbancias obtenidas de la solución patrón de LDH evaluada con una mezcla de sustratos fresca y con la misma mezcla almacenada durante 92.2 horas (aproximadamente 4 días), se observa que la mezcla es bastante estable ya que en 92.2 horas la absorbancia en la reacción disminuyó 10.39% con un tiempo de vida media calculado de 582.36 horas, es decir cada 582 horas con 21 minutos (aproximadamente 24 días) la absorbancia de la mezcla en la reacción se reducirá a la mitad.

En la **estabilidad de las soluciones** constitutivas de la mezcla de sustratos, al analizar las absorbancias obtenidas de la solución patrón de LDH evaluada con una mezcla de sustratos fresca y con una mezcla recién preparada pero con soluciones almacenadas durante 190.62 horas (aproximadamente 8 días), se observa que esta mezcla es más estable que cuando se almacenan los reactivos ya mezclados, ya que en 190.62 horas la absorbancia en la reacción disminuyó 5.89% con un tiempo de vida media calculado de 2173.15 horas, es decir cada 2173 horas con 9 minutos (aproximadamente 91 días) la absorbancia de la mezcla en la reacción se reducirá a la mitad.

En las absorbancias obtenidas de lisados de células CasKi con 100 (0.67%), 200 (1.33%), 600 (4.00%), 1800 (12.00%) y 5400 células (36.00%), se observa que el **límite de detección** corresponde a 600 células, es a partir de este punto en donde la gráfica (ver figura 11) demuestra ser lineal, ya que en los dos puntos anteriores

(100 y 200 células) el comportamiento de los valores de absorbancia no es directamente proporcional al número celular, sino todo lo contrario, la absorbancia correspondiente a 100 células es mayor que la correspondiente a 200 células. Esta diferencia, puede deberse a la sensibilidad del método o a que el volumen que se tomó para el cultivo fue muy pequeño (1.7 y 3.3 μ L respectivamente) considerando que se utilizó una pipeta multicanal de 200 μ L para ese ensayo.

El límite de cuantificación corresponde a 1800 células ya que es el primer punto que muestra una absorbancia (0.723) con una diferencia marcada (0.095 o 15.13%) con respecto al blanco (0.628) y que cumple con una buena precisión (± 0.025).

En la prueba de **selectividad** del método se puede observar (ver figura 12) como a mayor concentración del extracto, a pesar de sus múltiples componentes, hay mayor cantidad de células muertas por necrosis, lo cual, se deduce por la presencia de LDH detectada en el sobrenadante de los cultivos celulares. La absorbancia, la cantidad de LDH en el medio de cultivo y por lo tanto el número de células muertas por necrosis aumenta de manera directamente proporcional a la concentración de la resina de podofilina en el medio, pudiéndose obtener el 50% de células muertas por necrosis si se toma como 100% al cultivo tratado con tritón X-100 (un detergente que lisa la membrana celular).

11. Conclusiones

Se estandarizó un método en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza para cuantificar LDH en ensayos de citotoxicidad mediada por fármacos anticancerígenos sobre células de cáncer cervico-uterino. Este método cumple con los criterios de aceptación en los parámetros de una validación, es decir, el método es lineal, preciso, repetible, reproducible, selectivo, robusto y tolerante. La exactitud no se pudo comprobar debido a que no se cuenta con un estándar de LDH de las líneas celulares con las que se trabajó.

La mezcla de sustratos que contiene dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada (NAD^+), lactato de sodio, metosulfato de fenazina (PMS) y cloruro de idonitrotetrazolium (INT) en cantidades adecuadas y a un pH de 8.0, es adecuada para la detección y medición de LDH en ensayos de citotoxicidad con un tiempo de incubación de 25 minutos a temperatura ambiente.

La LDH en las muestras obtenidas para ser utilizadas en este ensayo no es estable ya que aún almacenando las muestras en congelamiento, la actividad óptica a 492nm decae rápidamente por lo que se recomienda realizar el ensayo con las muestras frescas.

La mezcla de sustratos es estable durante varias semanas, las soluciones individuales son aún más estables que la mezcla, sin embargo, tanto la solución de meto sulfato de fenacida (PMS) como la mezcla no deben utilizarse si se observa que el color de la mezcla ha cambiado, del color amarillo original a un color verde. Se recomienda preparar las soluciones en cantidades adecuadas para que no permanezcan en almacenamiento por más de un mes y en el caso de la mezcla de sustratos que no permanezca en almacenamiento por más de tres semanas. Las soluciones y la mezcla de sustratos deben almacenarse protegidos de la luz en congelación (-20°C) y en refrigeración ($4-6^{\circ}\text{C}$) respectivamente.

La mezcla de sustratos estandarizada en este trabajo puede sustituir a los estuches comerciales con una sensibilidad adecuada lo cual ayudara a optimizar costos y tiempos en la compra y adquisición de este producto.

12. Perspectivas

Con el trabajo realizado se da validez a un método, el cual se espera que en un futuro sirva para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad in vitro sobre cultivos celulares en el laboratorio 2 de la planta baja de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza de una manera confiable, ayudando así de forma importante en la obtención de datos requeridos para la investigación de nuevos fármacos anticancerígenos y optimizando los recursos al economizar en costos y tiempo cuando se sustituya al estuche Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay por el método aquí desarrollado.

13. Referencias bibliográficas

1. Burstein H J, Harris J R, Morrow M. Malignant tumors of the breast. En: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. Principles and Practice of Oncology. 9th ed. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. 1401-1456.
2. Marie-Knaul F, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. Salud Pub Mex. 2009; 51(2):355-344
3. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. SNAVE [Internet]. 2011[citado en 11 marzo de 2016]; 1: 23. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2011/monografias/P_EPI_DE_LOS_TUMORES_MALIGNOS_M%C3%A9xico.pdf
4. García A, Soberón E, Cortés M, Rodríguez R, Herrera J L, Alcántara A. Guía de validación de métodos analíticos. Colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos. México. 2002.
5. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Introducción a la Biología Celular. 2^a ed. México: Médica Panamericana; 2006.
6. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP et al. Biología Celular y Molecular. 5^a ed. México: Médica Panamericana; 2005.
7. Maton A, Hopkins J, Lehart S, Warner D. Cells Building Blocks of Life. New Jersey: Prentice Hall; 1997.
8. Callen J.C. Biología celular: de las moléculas a los organismos. México: CECOSA; 2000.
9. Darnell J, Havey L, Biología molecular de la célula. 2^a ed. Baltimore USA: Scientific American Books; 1993.
10. Studzinski G. Cell growth and apoptosis. New York: Oxford University Press; 1995.
11. Bowen I, Bowen S. Programmed cell death in tumor and tissues. London: Chapman and Hall; 1990.

12. Rojas O. Inmunología (de memoria). 3^a ed. México: Médica Panamericana; 2006.
13. Heimann R, Powers C, Halpem H J, et al. Breast preservation in stage I and II carcinoma of the breast. *Cancer*. 1996; 78: 1722-1730.
14. Halsted W S. The results of operation for the cure of cancer of the breast performed at the Johas Hopkias Hospital. *Ann Surg*. 1894; 20: 497-555
15. Halsted W S. The results of operantions for the cure of cancer of the breast. *Ann Surg*. 1907; 46: 1-19.
16. Brisson J, Morin C, Fortier M, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions. *Am J Epidemiol*. 1994; 140 (9): 700-710.
17. Castellsague X, Bosch F, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*. 2002; 89: 191-199.
18. Schiffman M, Bauer H, Hoover R, Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1993; 85: 958-964.
19. Bosch F, Lorincz A, Muñoz N, Meijer C, Shah K. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-265.
20. Lorincz A, Temple G, Kurman R, Jenson A, Lancaster W. On-cogenic association of specific human papilloma virus types with cervical neoplasia. *J Int Cancer Inst*. 1987; 79: 671-7.
21. Choo KB, Chen CM, Han CP, Cheng WT, et al. Molecular analysis of cellular loci disrupted by papilloma virus 16 integration in cervical cancer: frequent viral integration in topologically destabilized and transcriptionally active chromosomal regions. *J Med Virol*. 1996; 49: 671-677.
22. Münger K, Werness B A, Dyson N, Phelps W C, Howley P M. Complex formation of human papilloma virus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*. 1989; 8: 4099–4105.

23. Scheffner M, Werness B A, Huibregtse J M, Levine A J, Howley P M. The E6 oncoprotein encoded by human papilloma virus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63 (6): 1129-36.
24. Cox C E, Pendas S, Cox J M, et al. Guidelines for sentinel node biopsy and lymphatic mapping of patients with breast cancer. *Ann Surg.* 1998; 227: 45-651.
25. Koneman E. Diagnóstico microbiológico. 6^a ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2006.
26. M. Repetto. Toxicología avanzada. Madrid: Díaz de Santos; 1995.
27. Hugh P, Lain W, Matthew W, Wenhe Z, Paul A, Douglas S, Malcolm D. The Trypanocidal Drug Suramin and Other Trypan Blue Mimetics Are Inhibitors of Pyruvate Kinases and Bind to the Adenosine Site. *J Biol Chem.* 2011; 286(36): 31232–31240.
28. Babich H, Borenfreund E. Cytotoxic and morphological effects of phenylpropanolamine, caffeine, nicotine, and some of their metabolites studied *In vitro*. *Toxicol In Vitro.* 1992; (6):493-502.
29. Rotman B, Papermaster B. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic. *Proc Natl Acad Sci.* 1966;55(1): 134-141
30. Repetto M, Camean A. Toxicología avanzada. Madrid: Díaz de Santos; 1995.
31. Díaz J, Fernández M, Paredes F. Aspectos básicos de bioquímica clínica. Madrid: Díaz de Santos; 1997.
32. Montaner J. Fisiopatología de la isquemia cerebral. Barcelona: Marge; 2007.
33. Wroblewski F, Gregory K. Lactic dehydrogenase isoenzymes and their distribution in normal tissue and plasma and in disease states. *Ann NY Acad Sci.* 1961; 94:912-932.
34. Agostoni A, Vergani C, Villa L. Intracellular distribution of the different forms of lactic dehydrogenase. *Nature.* 1966; 209:1024-1025.

35. Cahn D, Kaplan O, Levine L, Zwilling E. Nature and development of lactic dehydrogenase. *Science*. 1962; 136:962-969.
36. Donald Voet. Judith G. Charlott W. *Fundamentos de Bioquímica (la vida a nivel molecular)*. 2ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2007.
37. Koolman J. *Bioquímica: texto y atlas*. México: Panamericana; 2005.
38. Nachlas M. The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. *Anal. Biochem*. 1960; 1: 317–26.
39. Korzeniewski C. Callewaert D. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*. 1983; (64), 313-20.
40. Decker. T. Lohman-Matthes M. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Meth*. 1988; (115); 61-19
41. Rozeta E, Marina R, Ziemonsa E, Boulanger B. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. *J. Pharm Biomed Anal*. 2011; 55: 848–858.
42. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados, centros de investigación o instituciones hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. *Diario Oficial de la Federación* 6 de mayo de 2013.
43. www.promega.com (Internet). México: Promega; (actualizado en agosto del 2015; citado el 31 de enero del 2015). Disponible en: <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/cytotox%2096%20nonradioactive%20cytotoxicity%20assay%20protocol.pdf>
44. Moravec. R. Total cell quantitation using the Cyto Tox 96Non-Radiative Cytotoxicity Assay. *Promeganotes*. 1994; (45), 11-12

45. Weidman E. Brieger J. Jahn B. Hoelzer D. Bergmann L. Mitrou P. S. Lactate dehydrogenase-release assay: a reliable, nonradiative technique for analysis of cytotoxic lymphocyte-mediated lytic activity against blasts from acute myelocytic leukemia. *Ann Hematol.* 1995; (70): 153-158.