

8. MTT

1. Lavar a garrafa de células 2 x com PBS 1X estéril aquecido em banho-maria à 37°C.
2. Adicionar a quantidade usual de tripsina necessária para individualização das células.
3. Incubar a garrafa de 2-5 minutos em estufa à 37°C, até a soltura do tapete celular.
4. Ressuspender o tapete celular.
5. Centrifugar em baixas rotações (2000 rpm por 2-3 minutos).
6. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet de células com 1mL de MEM (Suspensão Pré-pronta).
7. Retirar 20µL das células ressuspensas em MEM e misturar com 380µL de Azul de Tripán 0,002 %.
8. Colocar essa suspensão na Câmara de Neubauer para contagem. Contar as células presentes nos 4 quadrantes maiores e multiplicar esse valor por 50.000 (devido as diluições efetuadas).

Ex.: 60 células nos 4 quadrantes x 50.000 = 3000000 = $30 \cdot 10^5$ células/mL.

9. Ajustar a quantidade de células para o que se deseja obter.

Ex.: MDBK: $1,6 \times 10^5$; Hep: 2×10^5 ; CRFK: 3×10^5 ; MA 104: 2×10^5

$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$

Onde: C₁: quantidade de células por mL.

V₁: volume da garrafa.

C₂: quantidade de células que preciso obter

V₂: volume que se vai precisar de MEM + soro 5%

10. Misturar a solução pré-pronta com o volume de MEM + soro 5% desejado (V₂).
11. Distribuir 200µL dessa suspensão por poço em uma placa de 96 cavidades;
12. Incubar a placa em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 24h (até a formação de tapete celular).

13. Após as 24 horas retirar o meio e acrescentar as diluições dos compostos em triplicata e incubar pelo tempo necessário (MDBK: 24 horas; Hep e CRFK: 48 horas; MA 104: 72 horas).
14. Observar o tapete celular ao microscópio para se verificar a toxicidade dos compostos.
15. Retirar os compostos e adicionar 50µL de MTT numa concentração de 1mg/mL por poço (o MTT pode ser solubilizado em PBS em uma concentração maior e ser armazenado em -20 °C, e no momento do uso ser diluído em MEM)
16. Incubar a placa em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ até a formação de coloração violácea (MDBK: 2 horas; Hep, CRFK e MA 104: 4 horas).
17. Retirar o MTT e acrescentar 100µL/poço de DMSO puro, para solubilizar os cristais de Formazan.
18. Deixar a placa por 15 minutos no *shaker* para completa homogeneização.
19. Transferir o sobrenadante para uma nova placa.
20. Proceder a leitura da placa nova em leitor de ELISA a 540nm.