

7. Determinação da viabilidade celular (Azul de Tripan)

1. Trypsinizar as células como de rotina;
2. Individualizar as células com auxílio de pipeta, aspirar e desprezar 10 vezes;
3. Ressuspender as células com uma solução de MEM, utilizar a metade do volume usado no cultivo;
4. Misturar 500 μ l da suspensão de células e 500 μ l de Azul de Tripan 0,2%;
5. Incubar por 5 minutos à temperatura ambiente;
6. Montar a câmara de Neubauer da seguinte forma: limpá-la com álcool 70° e colocar a lamínula;
7. Acrescentar à câmara montada, aproximadamente 250 μ L da solução células + Azul de Tripan 0,4%. Cuidando para que a solução se distribua uniformemente entre a câmara e lamínula;
8. O Azul de Tripan 0,4% só irá corar as células inviáveis. Com auxílio do microscópio, contar e anotar as células coradas e não coradas (mortas e vivas, respectivamente) presentes nos quadrantes. Não contar as células que estiverem sobre a linha limite ou fora dos quadrantes;
9. Contar 4 quadrantes e calcular a média, ou seja dividir por 4;
10. Calcular a viabilidade celular da seguinte maneira:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{(\# \text{ células viáveis})}{(\# \text{ células viáveis} + \# \text{ células mortas})} \times 100$$

Reagentes e Soluções:

1. Azul de Tripan (0,4%)

0,4g Azul de Tripan ----- 100ml de PBS