

	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DO REAGENTE XTT	NORMA N° NIT-LABIO-211	REV. N° 00
		PUBLICADO EM 00/2019	PÁGINA 1/6

SUMÁRIO

- 1 Objetivo**
- 2 Campo de Aplicação**
- 3 Responsabilidade**
- 4 Documentos de Referência**
- 5 Documentos Complementares**
- 6 Definições**
- 7 Equipamentos, Consumíveis, Soluções, Reagentes e outros Insumos**
- 8 Ensaio de Viabilidade e Citotoxicidade**
- 9 Histórico de Revisão e Quadro de Aprovação**

1 OBJETIVO

Esta norma estabelece o procedimento padrão para executar os ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade utilizando o reagente XTT, no Labio.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO

Esta norma se aplica aos usuários do Labio.

3 RESPONSABILIDADE

A responsabilidade pela emissão, cancelamento e revisão desta norma é do Labio.

4 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Manual do Fabricante	Xenometrix AG; XTT – Tetrazolium Hydroxide Kit; Art. N° KXTT96.1200; Lote KXT2330, Allshwil, Suíça.
----------------------	---

5 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

NIT-LABIO-236	Operação e Higienização da Cabine de Segurança Biológica THERMO SCIENTIFIC MODELO 1385
NIT-LABIO-208	Paramentação e Higienização para uso da Sala de Cultura de Células
NIT-LABIO-201	Identificação e Controle de Qualidade de Meios e Soluções Utilizados
NIT-LABIO-202	Recebimento, Identificação e Controle de Qualidade de Cultura de Células de Mamíferos
FOR-DIMAV-091	Registro de Meios e Soluções
FOR-DIMAV-081	Registro de Cultura de Células
FOR-DIMAV-084	Procedimento Diário de Cultura de Células

	NIT-LABIO-211	REV. 00	PÁGINA 2/4
---	--	--	---

6 DEFINIÇÕES

6.1 Siglas

XTT 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)

DIMAV Diretoria de Metrologia Aplica a Ciências da Vida

PBS Tampão Fosfato-Salino

SFB Soro Fetal Bovino

Nota 1: As siglas das UP/UO do Inmetro podem ser acessadas em:
<http://intranet.inmetro.gov.br/tema/qualidade/docs/pdf/siglas-inmetro.pdf>.

6.2 Termos

Não se aplica.

7 EQUIPAMENTOS, CONSUMÍVEIS, SOLUÇÕES, REAGENTES E OUTROS INSUMOS

7.1 Equipamentos

- Cabine de Segurança Biológica THERMO SCIENTIFIC MODELO 1385
- Aagitador orbital
- Estufa úmida de CO₂ Galaxy 170R – New Brunswick, Eppendorf)
- Espectrofotômetro com filtro de 480 nm e 690 nm
- Micropipeta Monocanal ou Multicanal
- Microscópio óptico invertido

7.2 Materiais:

- Placa de 96 poços
- Ponteiras compatíveis com as pipetas
- Tubos estéreis

7.3 Soluções/Reagentes:

- PBS
- Meio sem vermelho de fenol (DMEM ou RPMI)
- Soro Fetal Bovino
- XTT - Tetrazolium Hydroxide Kit:
 - 1x Substrate Solution XTT I
 - 1x Buffer Solution XTT II

	NIT-LABIO-211	REV. 00	PÁGINA 3/4
---	--	--	---

8 ENSAIO DE VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE

- Para a realização do ensaio, o responsável deve organizar-se com antecedência, separando todo o material que será utilizado, bem como, reservando os equipamentos necessários para o procedimento;
- O operador responsável pelo procedimento deve estar utilizando os EPIs necessários para o procedimento, conforme NIT LABIO 208 – Paramentação e Higienização para uso da Sala de Cultura de Células.
- Os reagentes adquiridos do fornecedor deverão dar entrada, através do formulário FOR DIMAV 091 – Registro de Meios e Soluções, e passar pelo controle de qualidade do laboratório, conforme NIT LABIO 201 – Identificação e Controle de Qualidade de Meios e Soluções Utilizados;
- As células utilizadas no ensaio deverão dar entrada, através dos formulários FOR DIMAV 081 – Registro de Cultura de Células e FOR DIMAV 084 – Procedimento Diário de Cultura de Células, conforme NIT LABIO 202 – Recebimento, Identificação e Controle de Qualidade de Cultura de Células de Mamíferos.

8.1 Metodologia

- 8.1.1** No primeiro dia de experimento, em Cabine de segurança biológica, deve-se plaquear as células em placas de cultivos de células utilizando o meio de cultivo e suplemento necessário para as células. Estas, deverão ser incubadas em estufas úmidas de CO₂ por 24 h ± 2h.
- 8.1.2** Após 24 h ± 2h, deve-se remover o meio de cultivo dos poços da placa, expor as células a substância teste e incubar as células tratadas em estufas úmidas de CO₂ pelo tempo necessário para a realização do ensaio (Ex: 24 h, 48 h, 72 h e 96 h).
- 8.1.3** No dia ou tempo de realizar o ensaio de XTT, antes de iniciar o ensaio é de extrema importância examinar todos os poços ao microscópio óptico invertido para identificar eventuais erros de plaqueamento e características de crescimento das células controles e tratadas.
- 8.1.4** Registrar quaisquer alterações morfológicas das células devido aos efeitos de citotoxicidade da substância teste. Registrar também outras características indesejáveis como, por exemplo, precipitados da substância teste, poços contaminados, artefato.
- 8.1.5** Estando tudo certo para a realização do ensaio, aquecer as soluções que serão utilizadas a 37°C, por 5 minutos.
- 8.1.6** Uma única vez, adicionar e retirar cuidadosamente 100 µL de PBS em cada poço da placa de 96 poço.
- 8.1.7** Em seguida, acrescentar 100 µL de Meio 5% SFB sem vermelho de fenol.

	NIT-LABIO-211	REV. 00	PÁGINA 4/4
---	---------------	------------	---------------

8.1.8 Preparar em Cabine de Segurança Biológica no momento da utilização a solução de XTT II + XTT I na proporção: 1: 100, respectivamente. *Para 72 poços, deve-se preparar 3,6mL de solução final, sendo 3,564mL do reagente XTT I e 36µL de XTT II.*

8.1.9 Acrescentar 50 µL da solução preparada acima em todos os poços, incluindo os brancos, no volume de 100 µL de Meio 5% SFB sem vermelho de fenol, do item 8.1.3.

8.1.10 Incubar a placa por 1h e 30 min em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a 37°C.

8.1.7 Homogeneizar o conteúdo dos poços com auxílio de uma pipeta multicanal.

Nota 2: Caso ocorra formação de bolhas de ar, retirá-las com auxílio de uma ponteira de 10 ou 100 µL para que não haja interferência na leitura.

8.1.11 Realizar a leitura em um leitor de multiplacas, espectofotômetro, em comprimento de onda 480 nm e 690 nm.

Nota 3: O resultado da leitura em 690 nm deve ser subtraído do resultado da leitura em 480 nm.

8.1.8 : Os registros de leitura devem ser salvos no computador acoplado ao leitor de multiplacas, espectofotômetro, em planilha do programa Excel, onde os resultados da leitura estarão em densidade óptica.

Nota 4: A análise estatística e gráficos podem ser gerados utilizando ferramentas e software à escolha do usuário.

9 HISTÓRICO DA REVISÃO E QUADRO DE APROVAÇÃO

Revisão	Data	Itens Revisados
000	Xxx/2020	▪ Emissão Inicial

Quadro de Aprovação		
	Nome	Atribuição
Elaborado por: <i>ou</i> Revisado por:	Paulo Emílio Correa Leite Priscila Grion de Miranda Borchio	Pesquisador Bolsista Dimav Técnica Bolsista Dimav
Verificado por:	Luciene Balottin	Pesquisadora-tecnologista do Labio
Aprovado por:	Leonardo Boldrini	Chefe da UO