

# MODIFICACIÓN DE UN MÉTODO COLORIMETRICO QUE USA XTT, PARA LA DETERMINACION DE LINFOPROLIFERACION\*

José A. Bonilla; María Gabriela Mesón; Walter Cartín

Palabras clave: XTT, MU, linfoproliferación.

## RESUMEN

Los métodos para la determinación de proliferación celular se han basado tradicionalmente en la incorporación y detección de productos marcados con radioactividad. En este trabajo se describe una modificación de una técnica colorimétrica capaz de detectar la linfoproliferación. El estudio se llevó a cabo con linfocitos de 23 estudiantes universitarios voluntarios aparentemente sanos y se obtuvieron diferencias significativas ( $T_t > T_c$ ) entre linfocitos estimulados y no estimulados.

El método permite cuantificar la linfoproliferación por medio de una medición espectrofotométrica directa en un lector de ELISA. El número de células presente en cada pozo correlaciona con la capacidad de reducir la sal de tetrazol (XTT) a un producto coloreado y soluble. La sal es reducida principalmente por la actividad enzimática mitocondrial presente básicamente en las células vivas.

La técnica presenta las ventajas de ser simple, económica y segura si se compara

con los métodos que emplean radioactividad comúnmente usados; esto podría facilitar su introducción en Costa Rica, en los laboratorios de investigación y en el área hospitalaria, para el apoyo en el diagnóstico de problemas del sistema inmune. (Rev. Cost. Cienc. Med. 1993; 14(1, 2): 25-31).

## INTRODUCCION

Para la determinación de la proliferación linfocítica, tradicionalmente se han utilizado métodos radioactivos; éstos se basan en la incorporación de isótopos como la timidina tritiada ( $^3\text{H-Tdr}$ ) en las nuevas cadenas de ADN que se duplican durante la proliferación celular. La cantidad de  $^3\text{H-Tdr}$  incorporada es luego determinada por autoradiografía y conteo de partículas o por conteo en líquido de centelleo (1).

Recientemente, usando métodos colorimétricos, se han desarrollado nuevas técnicas para medir la supervivencia y proliferación linfocítica. La viabilidad celular puede ser determinada mediante diferentes técnicas de tinción, y medida por un espectrofotómetro de rastreo de pozos múltiples (lector de ELISA), el cual puede leer grandes cantidades de muestras con un alto grado de precisión y rapidez.

En 1983 Mosmann (2) utilizó la sal de tetrazol 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetra-zolbromuro (MTT) para determinar la toxicidad y proliferación celular. El anillo de tetrazol es roto principalmente por mitocondrias activas, y se piensa que otras regiones extracelulares con actividad succinato-deshi-

\* M.G. Mesón y W. Cartín desarrollaron este estudio como trabajo de graduación, válido para obtener el grado académico de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica en la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

\*\* Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular. Universidad de Costa Rica.

drogenasa (3) pueden contribuir a la producción del formazan total. Por lo tanto, la reacción sólo ocurre en células vivas.

El procedimiento con MTT ha sido utilizado en bioensayos para la detección de interleucinas como linfotoxinas y factores de crecimiento (4), IL-2 (5, 6), factor citotóxico de Células NK (5), factor de necrosis tumoral (TNF) (7) y principalmente, se han usado para medir la toxicidad en cultivos celulares en monocapa (8, 9).

Denizot *et al.* (10) y luego Hansen *et al.* (11) modificaron y mejoraron la técnica originalmente descrita por Mossmann (2). Sin embargo, varios autores consideran que el alto grado de variación que presenta dicho método, se debe a problemas técnicos (6, 7, 12).

Recientemente se desarrolló un nuevo método para tamizaje *in vitro* de sustancias anticancerígenas (8, 9). Este método utiliza la sal de tetrazol (3), 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamin-carbonil-2H-tetrazol hidróxido) (XTT) y como catalizador el N-metilfenacina metosulfato (PMS). El XTT reducido por enzimas celulares da una salde formazan soluble y coloreada (Fig. 1). En este trabajo se presenta una modificación de este método para utilizarlo en determinaciones de proliferación de linfocitos.

## MATERIAL Y METODOS

*Medio de cultivo.* Los linfocitos fueron cultivados en medio Dullbecco Modificado por Eagle (DMEM, Sigma) sin rojo fenol, suplementado con 5% de suero fetal bovino (Sigma), 50 µg/ml de estreptomycin, 100 UI/ml de penicilina, 2mM de L-glutamina, 5 nM de 2-mercaptoetanol, 10 mM de solución MEM de aminoácidos no esenciales (Sigma), 45 mM de bicarbonato de sodio, 25 mM de N-[2-hidroxietil] piperazina-N-[ácido 2-etanosulfónico] (HEPES) y 0,8 mM de glucosa.

*Extracción y cultivo de linfocitos.* Para la obtención de linfocitos humanos se utilizó sangre periférica, con EDTA de 23 estudiantes universitarios voluntarios con edades

entre los 20 y 35 años. La sangre se diluyó un volumen en dos en solución salina tamponizada estéril (PBS). Los linfocitos se separaron mediante gradientes de Ficoll-Hypaque (13), se lavaron dos veces con PSB estéril y se resuspendieron en medio de cultivo. Se cultivaron  $1,2 \times 10^5$  células por pozo/100 µl de medio en placas de 96 pozos de fondo en "U" (Corning), y se incubaron por 72 horas en cámara húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. La estimulación se hizo con PHA (Sigma) a una concentración de 20 µg/ml.

*Ensayo con XTT.* A las setenta y dos horas de incubación, se agregaron 50 µl/pozo de una solución fresca de 1 mg/ml de XTT y 0,01 -0,02 M de PMS en PBS estéril a 37°C, y se reincubó por 4 horas en oscuridad. Las placas se leyeron en un lector de ELISA (Dynateck MR 700), usando una longitud de onda de 490 nm, con un filtro de referencia de 630 nm y un ajuste de calibración de 1,99 (o de 1,00 si las muestras estaban fuertemente coloreadas).

## RESULTADOS

En la Figura 2 se observan diferencias significativas en la proliferación entre los linfocitos estimulados y no estimulados en PHA de los 23 estudiantes; estas diferencias corresponden a la absorbancia medida luego de cuatro horas de incubación con el XTT.

Los resultados de la Figura 2 se presentan en porcentajes de estimulación en la Figura 3; el promedio de estimulación de los donadores es de 73%, con valores extremos entre 23 y 175%. Los datos se analizaron estadísticamente con T de Student ( $T_t > T_c$ ). Aunque no se pudo obtener un 100% de reproductibilidad en los experimentos con linfocitos de las mismas personas, los resultados fueron satisfactorios. La Figura 4 corresponde a un gráfico que resume tres experimentos realizados en diferentes días con los mismos donantes.

El porcentaje de suero fetal bovino que se usó como complemento del medio de cultivo varió entre 0 y 20%. Los mejores resultados

se obtuvieron con 0 y 5%; sin embargo, los experimentos con menos resultados inespecíficos fueron aquellos en los que no se usó el suero fetal bovino.

## DISCUSION

El uso de un método colorimétrico que utiliza sales de tetrazol, como el XTT, permite cuantificar claramente diferencias significativas entre linfocitos estimulados y no estimulados (Fig. 2). Los porcentajes de estimulación variaron entre 23 y 175% con un promedio de 73% como se observa en la Fig. 3. Es importante hacer notar que los linfocitos de algunos donadores (3, 4, 5, 14, y 19 de la Fig. 2), presentaron lecturas bajas; sin embargo, sus porcentajes de estimulación están dentro de los valores promedio (Fig. 3). De aquí la importancia de reportar los resultados en porcentaje.

Las variaciones entre individuos pueden deberse entre otras cosas, a diferencias genéticas individuales, leucocitosis, linfopenia, el estado en que se encuentra el paciente a la hora de la toma de muestra (situaciones de estrés y otros estímulos), errores en el recuento de linfocitos y otros errores técnicos como cambio en los lotes y diferencias en la preparación de los reactivos. Otro aspecto importante es que se trabajó solamente con estudiantes universitarios voluntarios, aparentemente sanos y que corresponden a un solo grupo étnico. Sin embargo, no se tenía información detallada del estado de salud.

La Figura 4 muestra el grado de variación, en un experimento realizado con tres personas en tres diferentes días. Los valores fluctúan entre 45 y 53% en el primer paciente a 111 y 198% en el tercer paciente. Todos presentaron diferencias significativas entre los linfocitos estimulados y los no estimulados.

Otro aspecto interesante es que no se observaron alteraciones cuando se usó el medio del cultivo sin suero fetal bovino. Esto más bien parece mejorar la especificidad del método, ya que es conocido que los sueros

contienen factores que estimulan o inhiben inespecíficamente la multiplicación celular, pero se necesitan estudios más detallados que confirmen estas observaciones. Una ventaja, en este sentido, es que el método se abarata considerablemente, debido al alto costo del suero.

La reducción del MU a un derivado de formazán por células vivas, es un principio muy útil en el que se basó el ensayo descrito por Mosmann (2), y otros (5). El protocolo de Mosmann es simple, pero tiene varios factores que limitan su uso, como es la dificultad de solubilizar el producto de formazán en un solvente parcialmente orgánico sin precipitar las proteínas séricas del medio. Esto es todavía más problemático cuando se utilizan células no adherentes como los linfocitos. Además, era necesario eliminar el rojo de fenol del medio de cultivo para evitar interferencias en el lector de ELISA.

Hansen *et al.* (11) y Denizot *et al.* (10) mejoraron el método por Mosmann, e introdujeron varias modificaciones, pero esto llevó a una serie de pasos adicionales que introducen variabilidad en el método. Es por esta razón, que se sustituyó el MTT por el XTT, el cual al ser reducido por células vivas, da lugar a un producto soluble y coloreado cuya absorbancia puede ser leída directamente en un espectrofotómetro, sin necesidad de etapas de lavado de células, solubilización del formazán y centrifugación necesarias como cuando se usa el MTT.

Se ha reportado que el tiempo óptimo de incubación de las células con el XTT-PMS para el desarrollo de color es de cuatro horas (9). Esto podría variar dependiendo tanto del estado metabólico de los linfocitos, como de la cantidad de sustrato disponible, debido a que es necesario prepararlo fresco cada día, y es sensible a la luz. Así, a mayor actividad celular y/o sustrato presente, se desarrolla más color en menor tiempo o viceversa. Sin embargo, el desarrollo de color óptimo puede ser estimado a simple vista, en algunos casos 2 horas son suficientes pero ninguno demoró más de 4 horas.

Los aumentos en las densidades ópticas pueden ser el resultado de contaminación

bacterianas, ya que las bacterias pueden reducir el XTT (11) y la ausencia del indicador de pH en el medio dificulta su detección. Hay que tener en mente que los ensayos con XTT dependen del número de células presentes y de su actividad mitocondrial, por ello algunos tipos celulares pueden dar resultados diferentes cuando se comparan los métodos colorimétricos con los que utilizan sustancias radioactivas (1, 12), ya que se miden parámetros diferentes.

Por estas razones, se deberían repetir los valores extremos, tanto los altos como bajos, y es recomendable que todas las determinaciones vayan acompañadas de un hemograma que indique, sobre todo, el número de linfocitos en la muestra.

Este método para medir linfoproliferación es confiable, sencillo y económico, y recomendamos su uso, tanto en el área hospitalaria para apoyar el diagnóstico de problemas inmunológicos como para la investigación. Sin embargo, se debe enfatizar que la sensibilidad del mismo es menor que la de los métodos que utilizan radioactividad. Además, el método se debe estandarizar en cada laboratorio en donde se desee utilizar, y los valores de referencia para la población costarricense deben ser definidos, ya que este trabajo es sólo preliminar, y pretende demostrar que es factible introducir esta clase de metodologías en Costa Rica.

#### **ABSTRACT**

*Cellular proliferation has been measured traditionally by detecting the incorporation of radioactively marked products. This article describes a modification of a colorimetric technic for lymphoproliferation. The study was done with lymphocytes from 23 voluntary and apparently healthy donors. Significant differences were obtained ( $T_t > T_c$ ) between stimulated and unstimulated lymphocytes. This method quantifies lymphoproliferation by direct spectrophotometric measurement in an ELISA reader. Cell count correlated with its capacity to reduce a Tetrazolium salt (XTT) to a soluble and colored*

*product. XTT is reduced basically by mitochondrial enzymatic activity in living cells.*

*The method is simple, inexpensive and reliable if compared with other radioactivity based methods commonly used. This could make easier it's introduction in Costa Rica, in research laboratories and mayor hospitals to support the diagnosis of immune system disorders.*

#### **AGRADECIMIENTO**

Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Figura 1. Estructuras químicas del XTT tetrazol (Incoloro) y la sal de formazán reducida (café-rojizo)

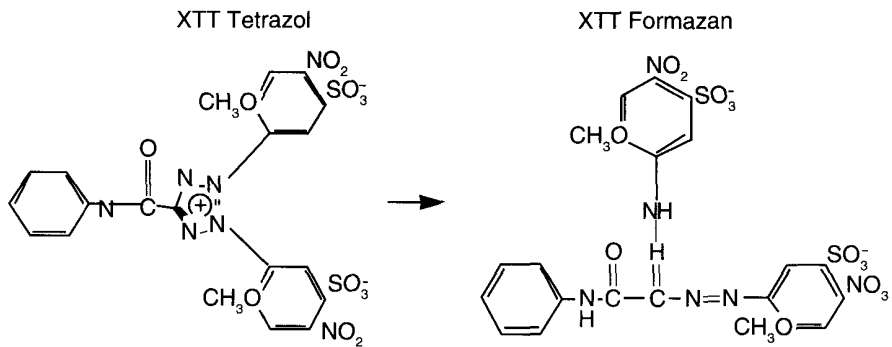
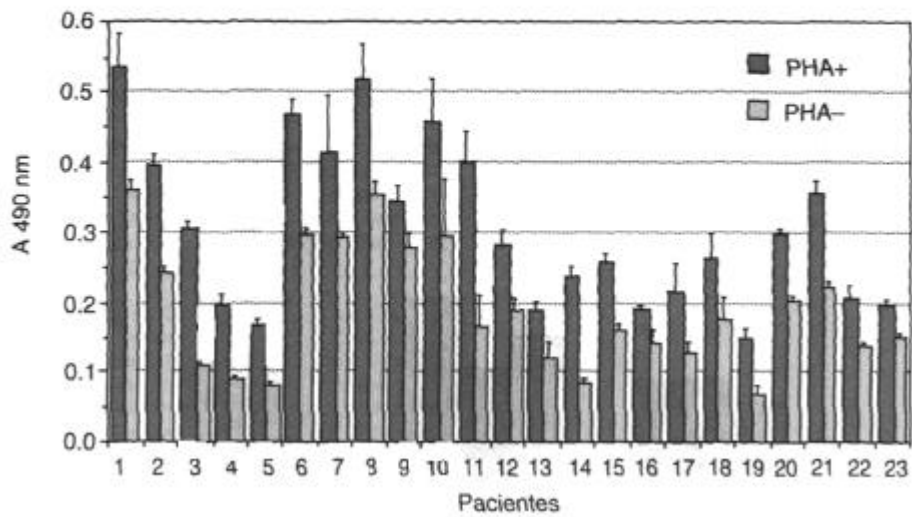
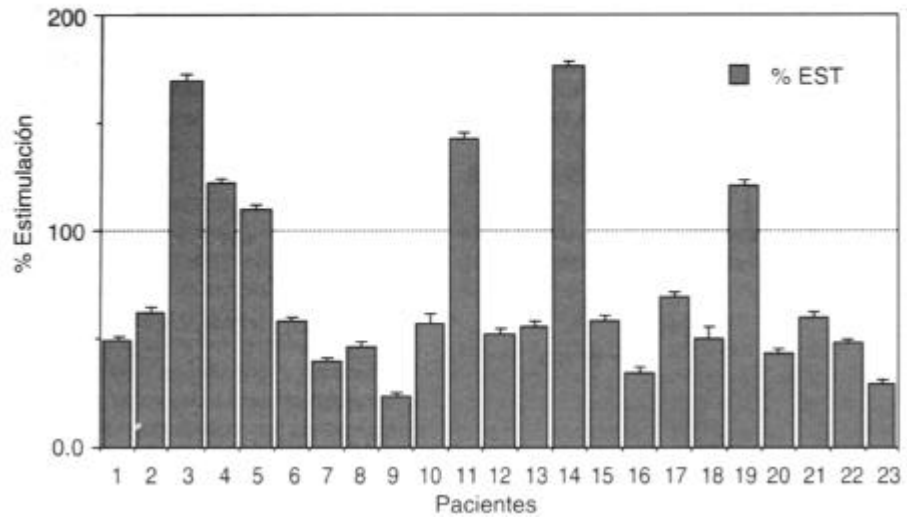


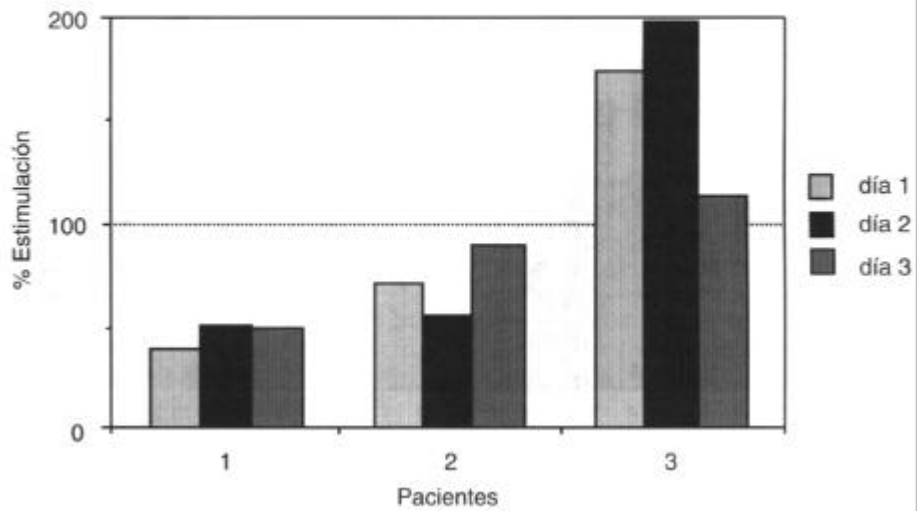
Figura 2. Determinación de las diferencias entre las absorbancias de linfocitos estimulados y no estimulados utilizando XTT y las cuatro horas de incubación



**Figura 3. Porcentajes de estimulación de linfocitos en una población de 23 estudiantes universitarios voluntarios aparentemente sanos. El promedio de estimulación es de 73% con variaciones que van de 23% a 175%**



**Figura 4. Determinación de la reproducibilidad del método colorimétrico con XTT para determinar la linfoproliferación. Se resumen tres experimentos realizados a los mismos donantes en días diferentes**



## BIBLIOGRAFIA

1. Stites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H., Wells, J.V.: *Basic Clinical Immunology*. 4th ed. Los Alamos, California. Lange Medical Publication. 1982; 366.
2. Mosman, T.: Rapid colorimetric assay for celular growth and cytotoxicity assays. *J. Immunol, Meth.* 1983; 65:55.
3. Paul, K.D., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R., *et al.*: The synthesis of XTT, a new tetrazolium reagent that is bio reducible to a watwer soluble formazan. *J. Heterocyclic Chem.* 1988; 25: 911-914.
4. Green, L. M., Read, J.L. Ware, C.F. (1984): Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantification of cytotoxic ant growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Meth.* 1984: 70-257.
5. Hegg, K., Reimann, J., Kabelitz, O., Hardt, C., Wagner, H.: A rapid colorimetric assay for the determination of IL-2 producing helper Tcell frequencies. *J. Immunol. Meth.* 1985; 77:237.
6. Tada, H., Shibo, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K.: An improved colorimetric assay for interleukin-2. *J. Immunol. Meth.* 1986; 93:157.
7. Espevick, T., Nissen-Meyer, J. A.: A higly sensitive cell line. Wehi 164 clone 13 for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J. Immunol. Meth.* 1986;2: 95-99.
8. Scudeiro, D.A., Shoemaker, R.H., Alley, MC., *et al.*: Evaluation of a soluble tetrazdium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Canc. Res.* 1988; 48: 4827-4833.
9. Weislow, O.S., Kiser, R, Fine, O.L., Bades, Shoemaker, R.H., Boyd, M.R.: New soluble formazan assay for HIV -1 cytopathic effects: Application to high flux screening of synthetic and natural products for AIDS antiviral activity. *J. Nat. Cancer Inst.* 1989; 81: 577-586.
10. Denizot, F., Lang, R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol. Meth.* 1986; 89: 271-277.
11. Hansen, M.B., Nialsen, S.E., Berg, K.: Reexamination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill, *J. Immunol. Meth.* 1989; 119: 203-210.
12. Neville, M.E.: Cr-uptake assay: A sensitive and reliable method to quantitate cell viability and cell viability and cell death *J. Immunol. Meth.* 1987; 99: 77.
13. Boyum, A.: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scan J. Clin. Lab. Invest.* 1968; 21 (Suppl. B9): 1-114.