

PROCOLO EXPERIMENTO DE ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE FÁRMACOS

DÍA 1 (MARTES): SEMBRAR LAS PLACAS.

Para las células que vamos a utilizar en este experimento, que son células MDCKII utilizaremos placas de 24 pocillos, cada uno de los cuales lleva 1 ml de medio con las células.

Tendremos 2 tipos celulares, unas células PARENTALES y otras que expresan la proteína transportadora Abcg2 de RATÓN. Ambos tipos celulares crecen a la misma velocidad por lo que sembraremos las dos a la misma densidad. Sembraremos a una densidad de **40.000 células por pocillo**.

Partimos de un frasco T-75 con las células confluentes (entre 6 y 8 millones de células).

1. Retiramos el medio del frasco
2. Lavamos con 5 ml de PBS
3. Añadimos 3 ml de Tripsina, agitar suavemente y dejar 10 minutos en incubador
4. Neutralizamos la Tripsina con 25 ml de medio fresco y cogemos muestra para contar
5. Contamos las células
6. Sembramos las células a una densidad de 40.000 células por pocillo teniendo en cuenta que cada pocillo lleva 1 ml de medio con células

DÍA 2 (MIÉRCOLES): OBSERVACIÓN DE PLACAS AL MICROSCOPIO PARA VER SI AL DÍA SIGUIENTE VAN A ESTAR CONFLUENTES.

DÍA 3 (JUEVES): EXPERIMENTO Y ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

1. Eliminar medio de las placas
2. Lavar con 1 ml de PBS por pocillo. Eliminar el PBS
3. **Preincubación.**
Añadir 1 ml de Optimem u Optimem+inhibidores si los hubiese en cada pocillo y dejar 1 hora en incubador
4. Eliminar tratamiento de preincubación
5. **Incubación.**
Añadir 1 ml de Optimem+Mitoxantrona a 10 μ M u Optimem+Mitoxantrona a 10 μ M+inhibidores si los hubiese en cada pocillo y dejar 1 hora en incubador
6. Eliminar tratamientos de la incubación
7. Lavar con PBS **frío** (para detener/ralentizar el metabolismo celular)
8. Tripsinizar con 100 μ l de tripsina/pocillo y dejar unos 10 minutos en incubador
9. Neutralizar la tripsina añadiendo en cada pocillo 500 μ l de PBS con suero frío al 2,5% (1ml de suero en 39 ml de PBS)
10. Homogeneizar y recoger en tubos de citómetro (**Hacer en hielo!!!!**)
11. Centrifugar 5 minutos a 4°C y 1000 r.p.m.
12. Eliminar el sobrenadante (**voltear el tubo una vez solamente**)
13. Resuspender las células de cada tubo añadiendo 200 μ l de PBS con suero frío al 2,5%
14. Analizar las muestras en el citómetro