

6. Tècniques bàsiques cultius cel·lulars

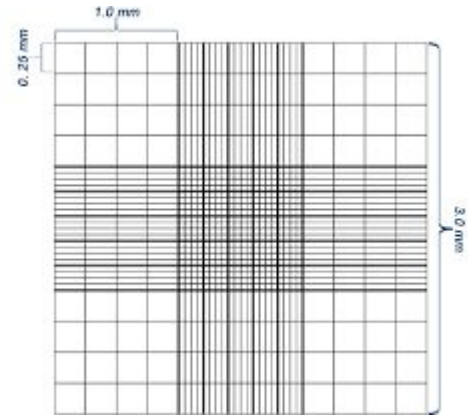
M02. Tècniques complementàries als cultius cel·lulars

Recòmpte cel·lular

Cambra de Neubauer



Comptador automàtic òptic

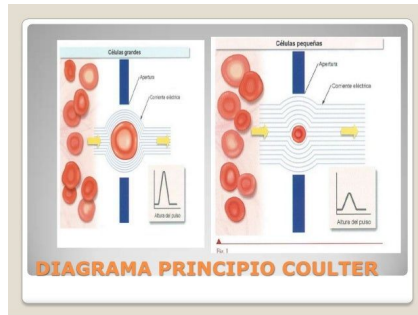


Comptador automàtic Coulter

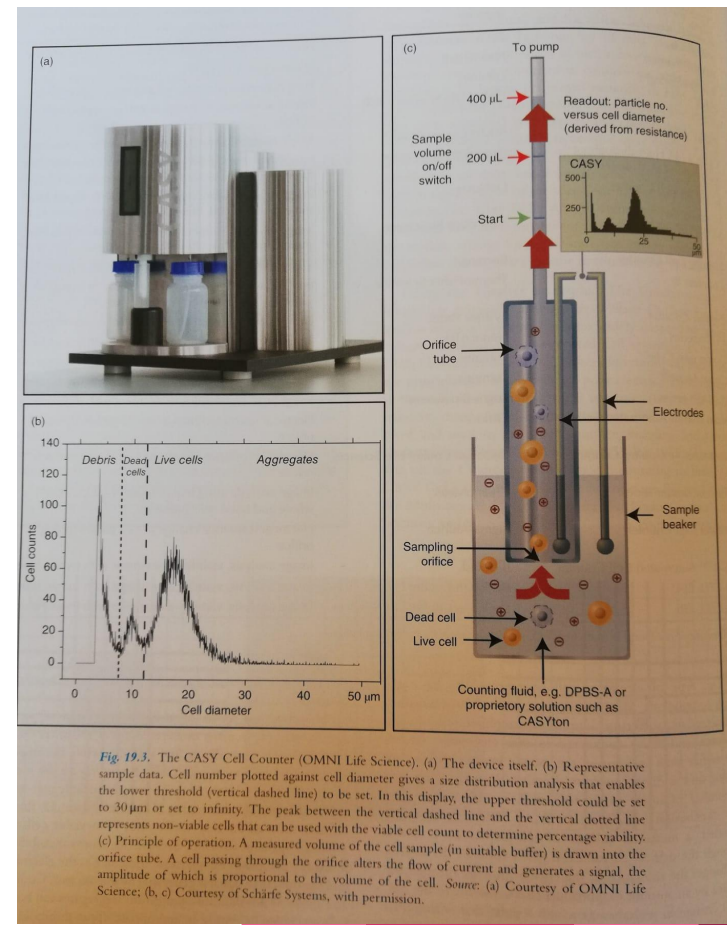


Contador Coulter

- S'utilitza per contar i medir partícules en solució.
- Principalment s'utilitza per contar cèl·lules sanguínies a hematologia
- Es mesura la diferència de voltatge entre dos cambres, i la intensitat dependrà de la mida.

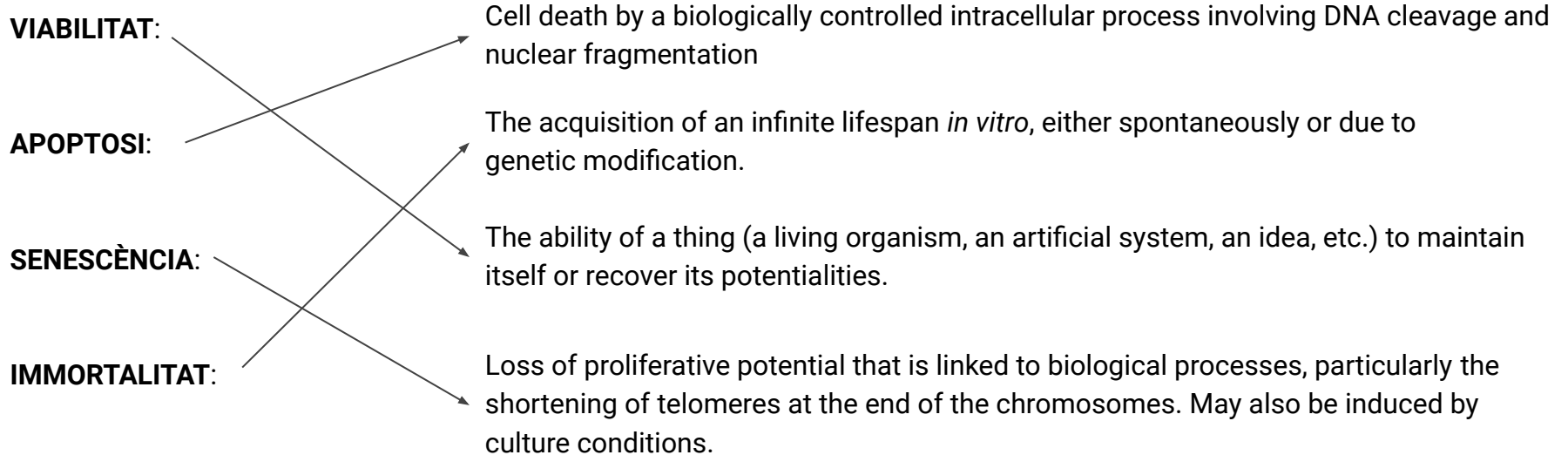


Activitat moodle:
comparació
d'instruments de
recompte cel·lular



Pràctica recompte cel·lular + exercicis

Conceptes




CITOTOXICITAT: Capacitat de lisar una cèl·lula, ja sigui per part d'una altra cèl·lula (cèl·lula citotòxica) o d'un compost químic (citotoxina), com l'afanastatina, limonoide present a *Aphanamixis grandifolia* .

VIABILITAT: Probabilitat que té un organisme de prosperar o de sobreviure.

SENESCÈNCIA: Envel·liment - Incapacitat de dur a terme la divisió cel·lular, de manera que les cèl·lules es queden en un estat de standby.

APOPTOSI: Procés de mort cel·lular programada controlada genèticament.



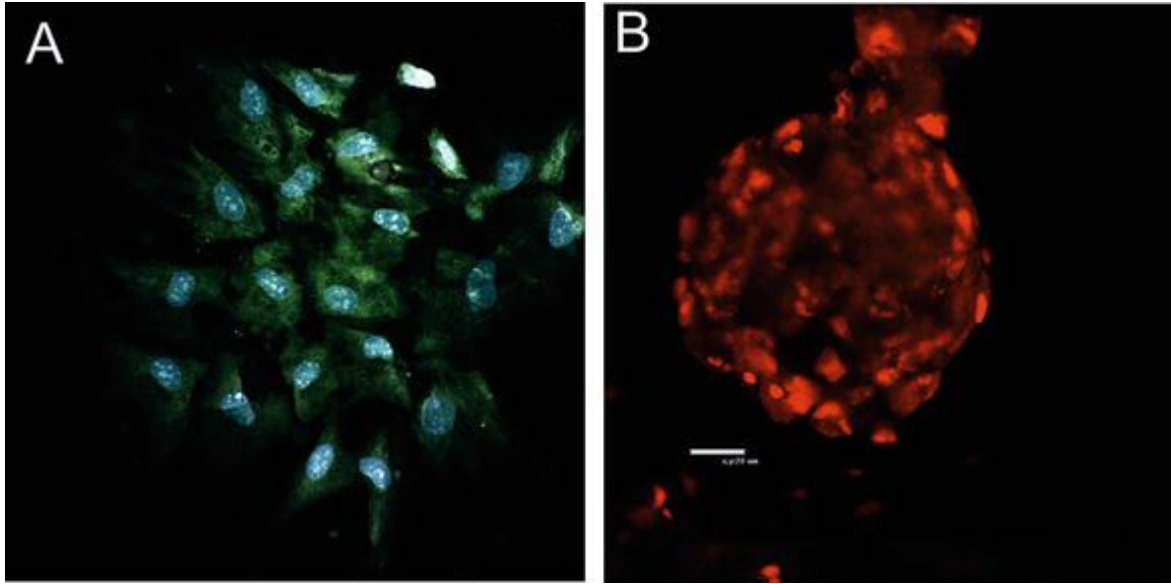
Tipus d'assajos

- **Tincions** (DYE - STAINING)
- **Fluorimètrics** → detecció de fluorescència a través d'un lector de plaques
- **Colorimètrics** → variació de l'absorbància d'una determinada longitud d'ona. Ens permeten observar canvis de color en resposta de reaccions químiques
- **Luminomètrics** → mesura de la llum

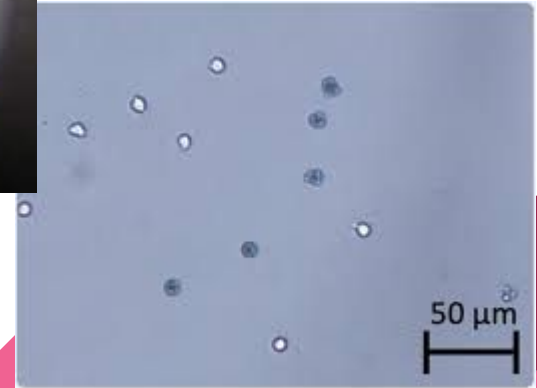
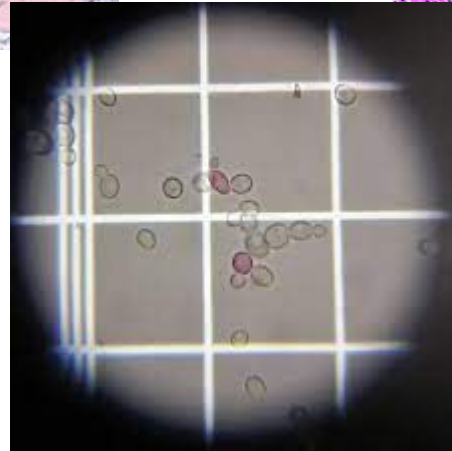
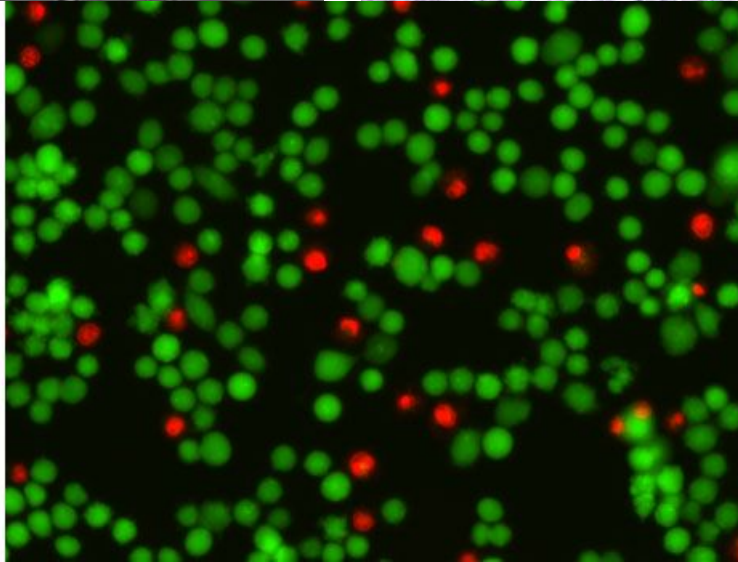
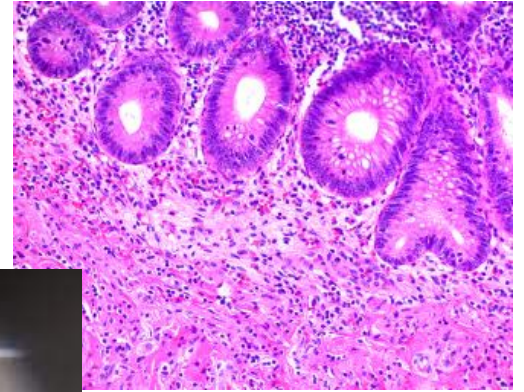
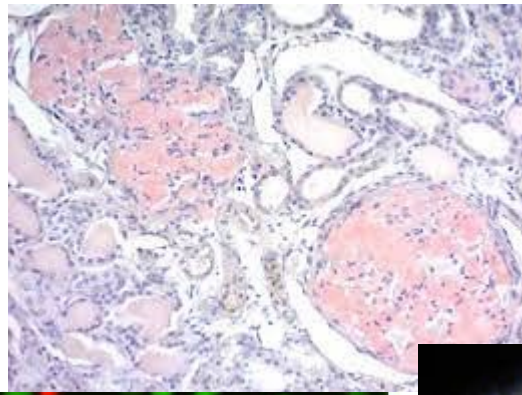
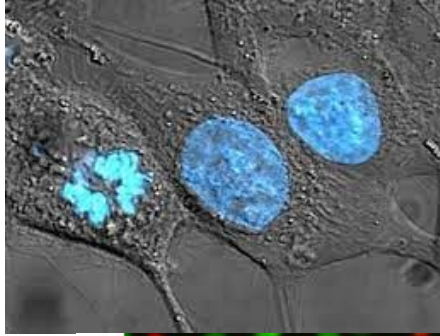


Tincions (dyes)

Blau de Tripà	El colorant entra en les cel·lules que tenen una lesió a la membrana cel·lular
Eosina	Tenyeix components citoplasmàtics - de càrrega positiva- d'una coloració rosada, però no els nuclis
Congo Red	Tincions dels bacteris Gram-, i les parets cel·lulars
Erytrosine B	Marca les cel·lules que han perdut la integritat de membrana
Propidium Iodide	Agent intercalable que s'uneix als àcids nucleics, principalment DNA. No és permeable a la membrana.
Hoechst	Tenyeix l'ADN de cel·lules eucariotes vives i fixades
DAPI	

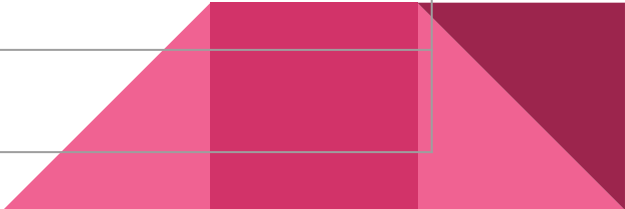


Bovine mammary epithelial cells immunostained against cytokeratins and DAPI-stained nuclei (confocal laser scanning microscopy, 400 \times) (A). Dome structures stained with propidium iodide (confocal laser scanning microscopy; magnification, 600 \times) (B)



Us de molècules fluorescentes

calceïna AM	
Diacetat de fluoresceïna	
iodur de propidi	
homodímer d'etidi	
taronja d'acridina	
blau alamar	
anexina	



“Assajos bàsics”

Assajos citotoxicitat

Assajos activitat inflammatòria

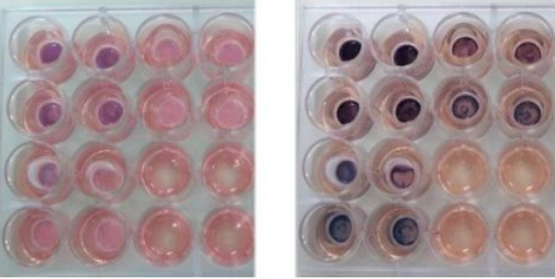
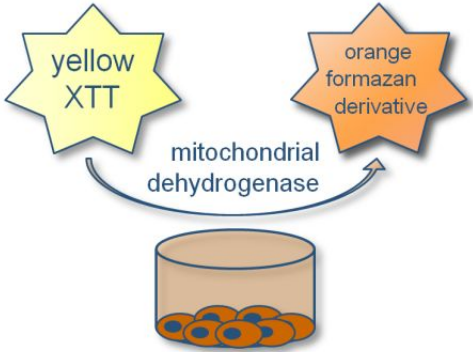
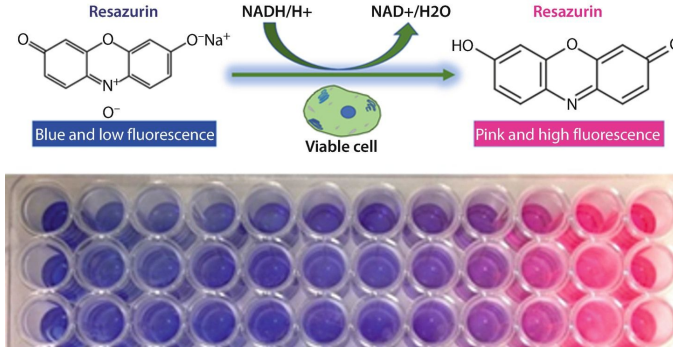
Assajos activitat metabòlica

Assaig cicatriu

Assajos mutagènesi

Determinació assajos citotoxicitat

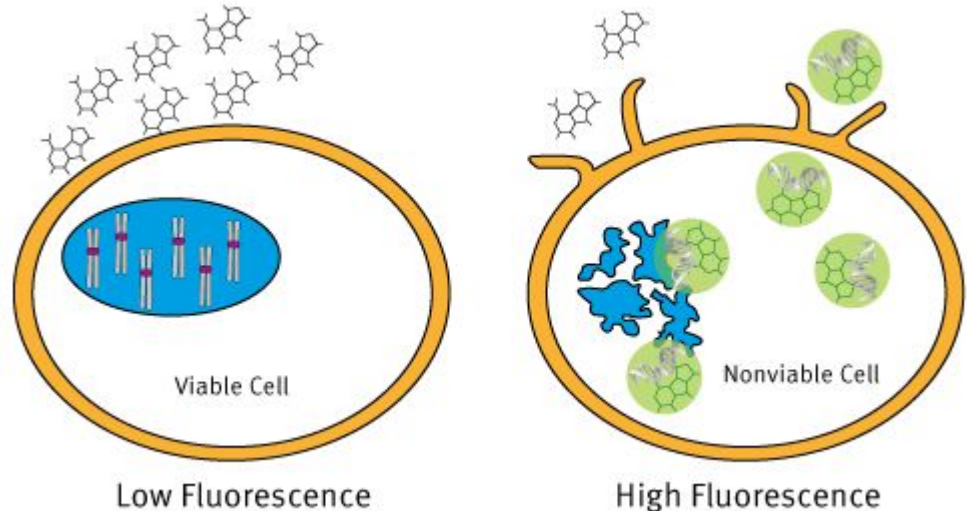
→ Objectiu?

Assaig MTT (viabilitat cel·lular)	XTT	Resazurina
		

Green cytotoxicity assay - Fluorimètric

Mesura la pèrdua de integritat de la membrana cel·lular

- S'uneix al DNA exposat i genera una senyal fluorescent.
- Senzill i molt estable → estudi a llarg plaç

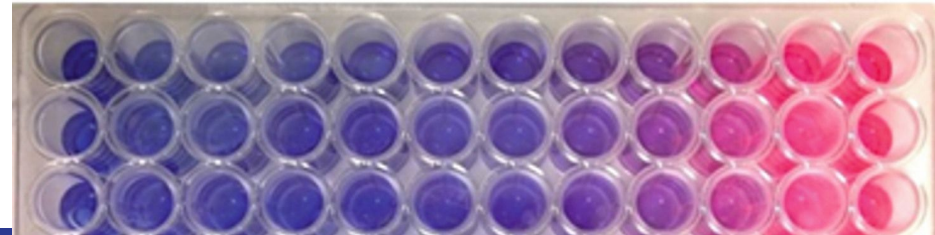
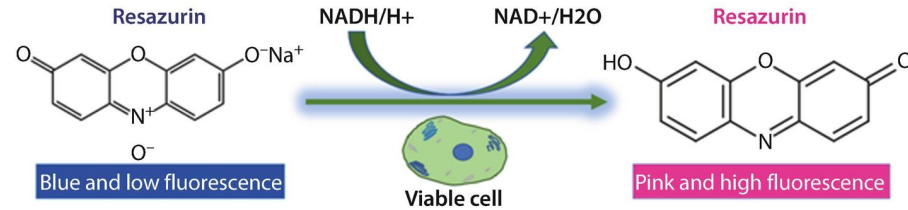


Mètode de reducció de la resazurina

Resazurina: té coloració blavosa i quan es redueix és de color roig fluorescent

Permet monitoritzar la proliferació cel·lular i la citotoxicitat

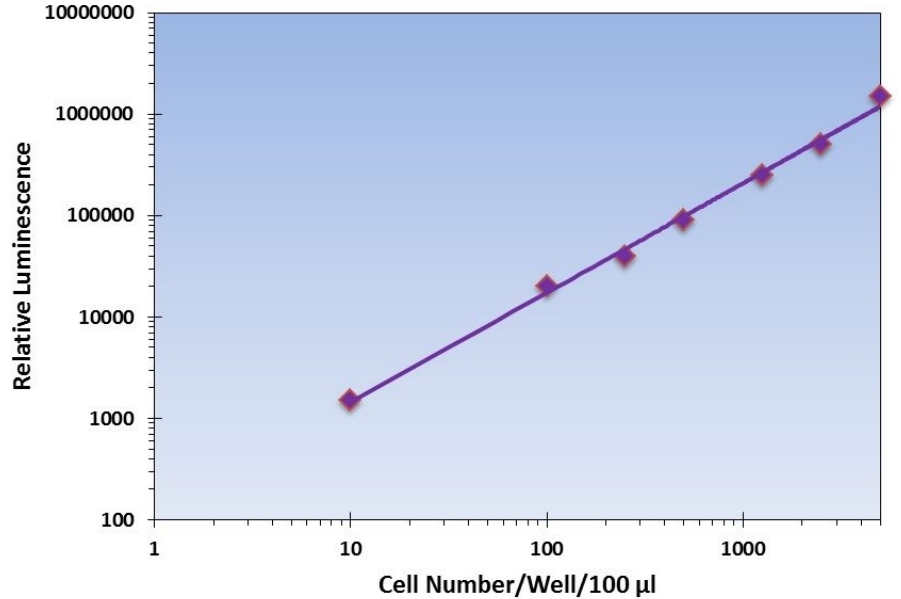
- Indicador de la oxidoreducció, indicant activitat metabòlica, més concretament funció mitocondrial



ATP assay - Luminometric

ATP has been found to be essential in light production in bioluminescence of firefly luciferase, a monomeric 61 kD enzyme that catalyzes a two-step oxidation of luciferin to yield light at 560 nm. The first step consists of protein activation by ATP to produce an intermediate that is a reactive mixed anhydride. This intermediate reacts with oxygen in a second step to create a transient dioxetane, which is quickly broken down into the oxidized products of oxyluciferin and carbon dioxide, along with the burst of light. With ATP as a limiting component, this light intensity is proportional to ATP concentration and can be monitored at 560 nm with a luminometer or other luminescence instruments.

<https://www.stratech.co.uk/aat-bioquest/luciferases/>



Tècniques de viabilitat cel·lular

Viabilitat cel·lular i proliferació

Quantificar:

- Numero de nuclis
- Activitat metabòlica
- Integritat mitocondrial
- Potencial redox



Tècniques determinació apoptosi - TUNEL

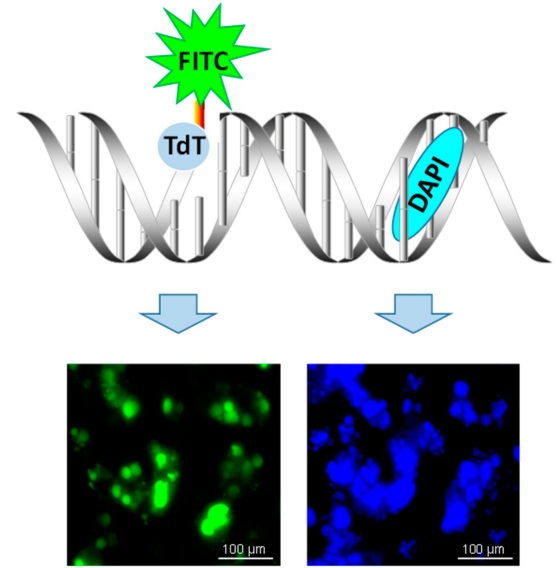
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

Apoptosi → caracteritzada per una degradació de l'ADN per nucleases.

Es marca l'extrem 3'-OH de les dobles cadenes fragmentades.

TdT és un enzim que catalitza la unió de dNTP *tagged* amb un fluorocrom o un altre marker

→ s'utilitza per detectar la viabilitat en espermogrames (FIV)

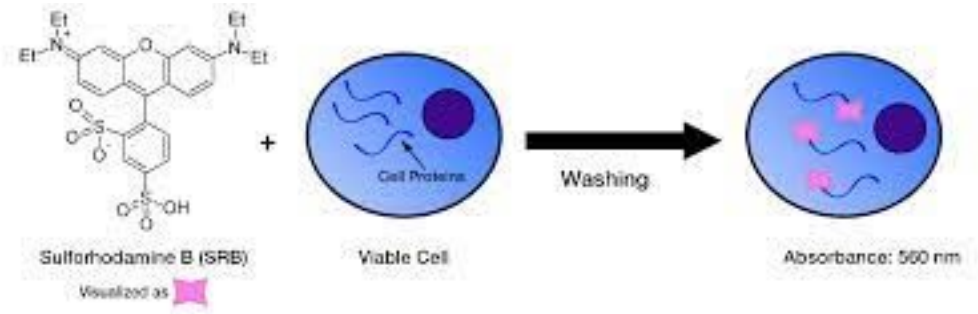


Tinció amb SRB (Sulforodamina B) - Colorimètric

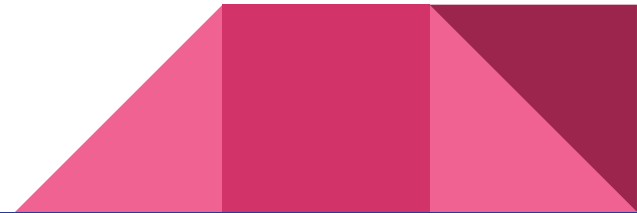
SRB: colorant aminoxantà (rosa brillant) que conté dos grups sulfònics - SO_3^- capaços d'unir-se electrostàticament a cations. En una dissolució àcida (àcid acètic) augmenta la seva afinitat pels AA bàsics de les proteïnes i s'hi fixa.

→ mesura la biomassa total al tenyir les proteïnes cel·lulars

- Cell density determination



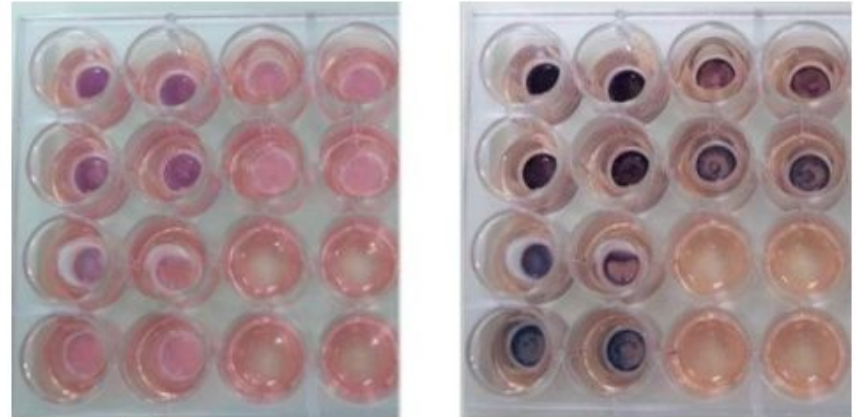
WST - Viabilitat



Assaig viabilitat cel·lular - MTT - Colorimètric

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide): compost, que en reduir-se, adquireix una tonalitat violeta i és insoluble en aigua.

- És un indicador d'activitat metabòlica → viabilitat cel·lular



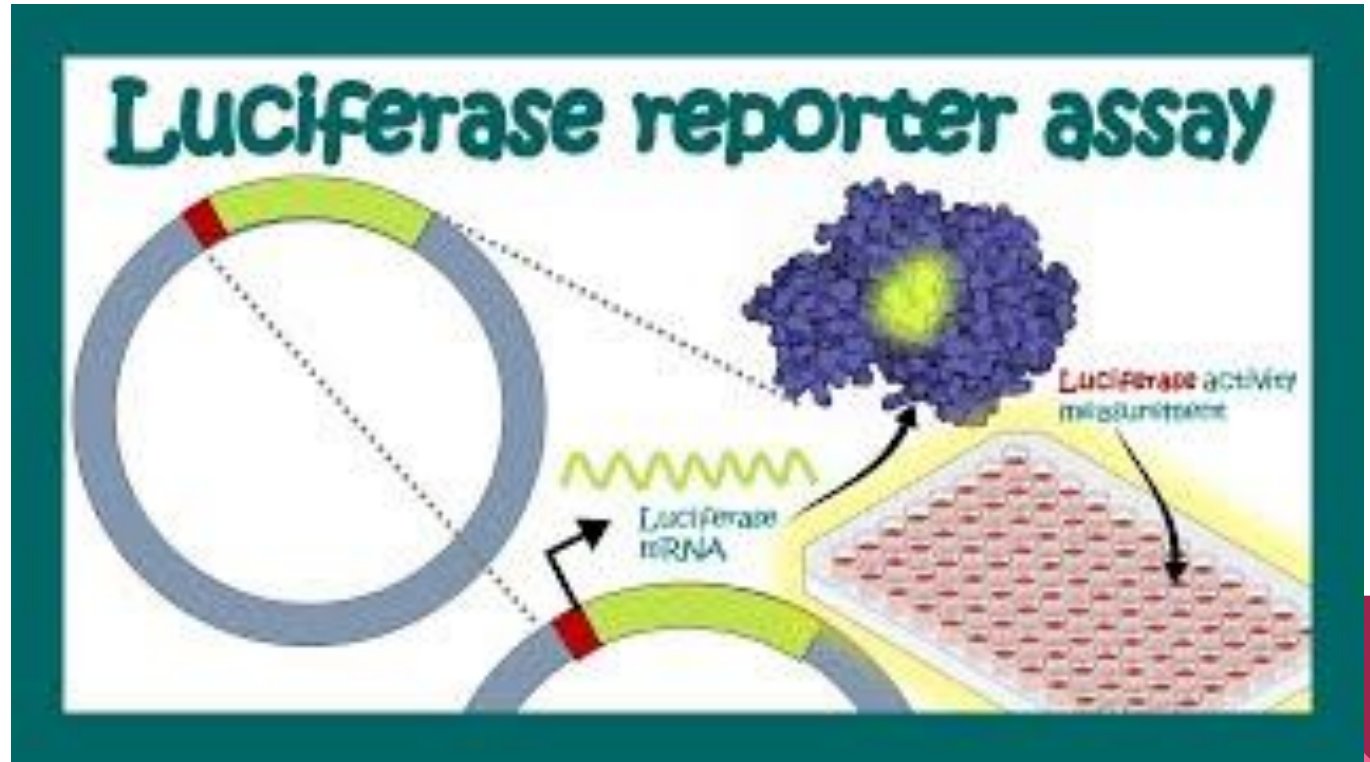
Laboratori Virtual

Cell Cycle Assay

With the Incucyte® Cell Cycle Assay, you can now quantify cell-cycle progression continuously over multiple cell divisions - inside your incubator. Gain deeper insight into treatment effects on cell cycle dynamics, or link cell cycle arrest to morphology and function using our unique and accessible approach to live-cell imaging and analysis.



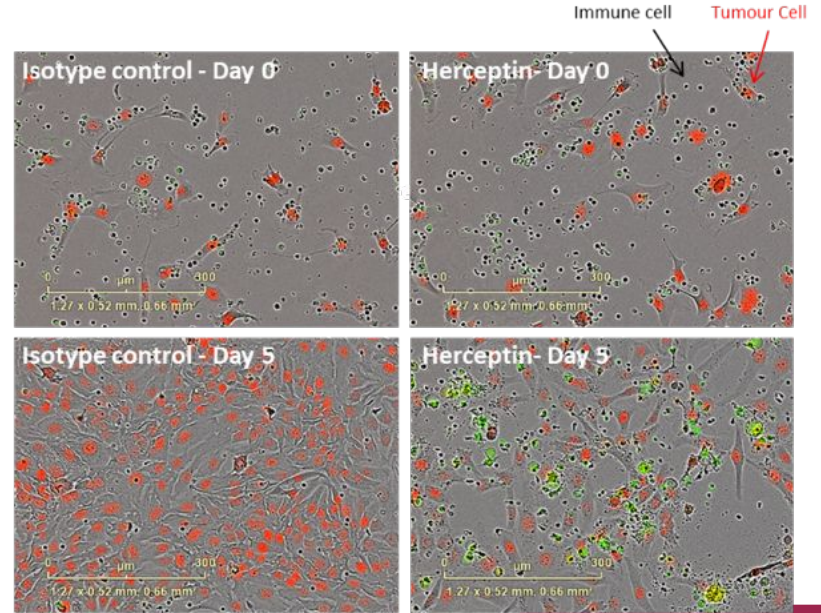
Luciferase Assay



Co-culture Assay

For many disease states, interactions and communication between different cell types play a critical role in disease initiation and progression. Whether it is the interplay between tumour and stromal cells, or the cellular interactions required for blood vessel formation, our ability to study and understand these interactions can be crucial in supporting the development of novel therapeutics.

Antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC)



Apoptosis positive object

Tumour cell nuclei

Permeabilització cel·lular

La permeabilització cel·lular sol ser necessària per a detectar epítops intracel·lulars i per a proteïnes de transmembrana.

En aquests casos, l'anticòs requereix accedir a l'interior de la cèl·lula per a detectar la proteïna i per a això es requereix d'algun procediment de permeabilització.

Podem utilitzar **Triton-X** o altres detergents.



Fixació cel·lular

La fixació cel·lular juga quatre papers crítics en la immunohistoquímica: – Estabilitzar la morfologia cel·lular i l'arquitectura del teixit

- Desactivar els enzims proteolítics
- Reforçar les mostres per a suportar el seu processament i tinció
- Protegir les mostres contra la contaminació microbiana i la descomposició

En immunohistoquímica una fixació adequada requereix no sols una immobilització ràpida i total de l'antigen, sinó també una conservació suficient de la seva *inmunorreactivitat i el manteniment de la seva accessibilitat als reactius *inmunoquímics per a la localització.

Existeixen diferents procediments químics i físics que es poden aplicar a la fixació cel·lular, si bé el fixador químic més àmpliament utilitzat és el formaldehid, que mostra una àmplia especificitat per a la majoria d'objectius cel·lulars.

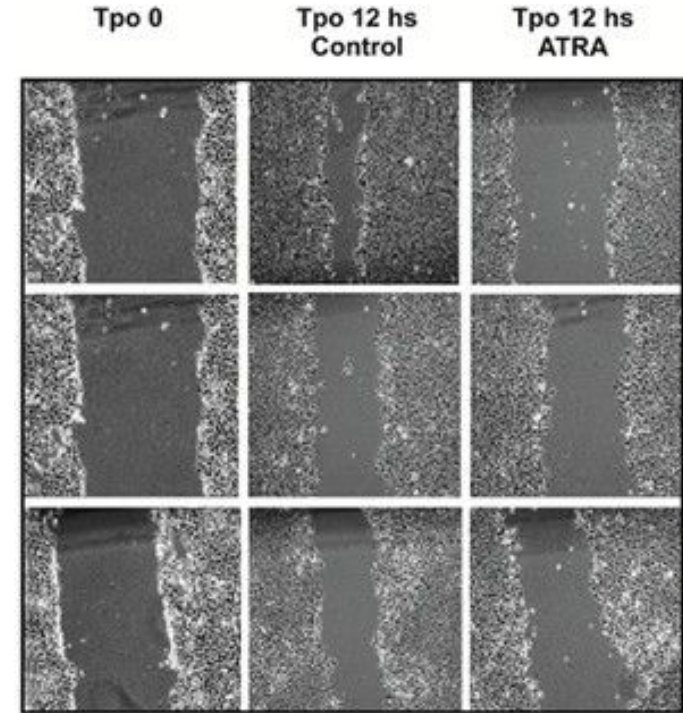
Podem utilitzar **formaldehid** (fixació), **metanol fred**(deshidrata les cèl·lules i les fixa permeabilizant la seva membrana)



Assaig cicatriu - Wound healing assay

Té l'objectiu d'estudiar la **migració cel·lular**

Consisteix en observar el comportament d'una monocapa de cèl·lules a la qual previamente se'ls hi ha fet una "ferida".



Principle



1. Prepare the Culture-Insert on a flat, clean surface



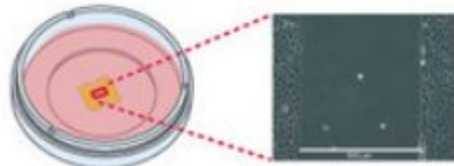
2. Seed cells and wait for cell attachment



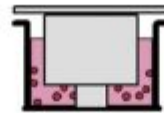
3. Remove Culture-Insert



4. Fill with medium

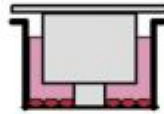


5. Microscopy of cell-free gap



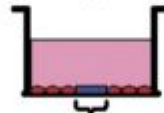
Cell suspension is added to the well with insert in place

Incubate 24-48 hours



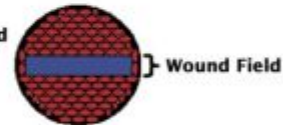
Cells are cultured until a monolayer forms

Remove insert to generate a 0.9mm "Wound Field"



Cells may be treated and monitored for migration into the wound field

Wound Field

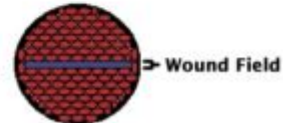


Wound Field



Cells migrate from either side of the gap until they close the wound field

Wound Field

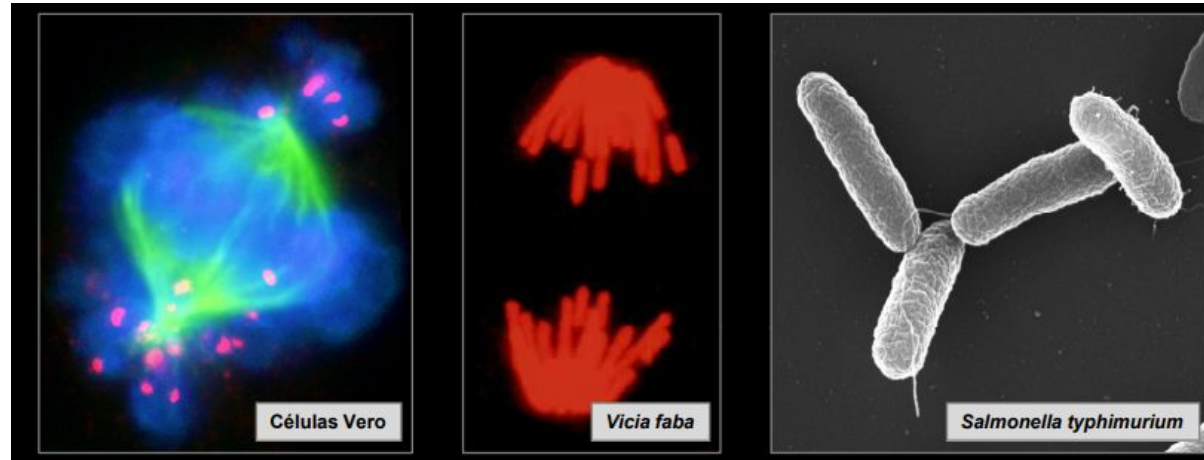


Wound Field

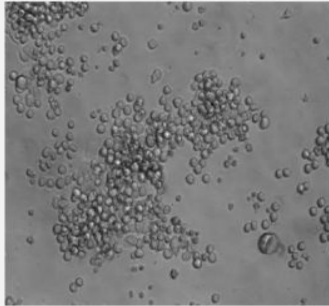


Assajos mutagènesi

- Estudi d'aberracions cromosòmiques → FISH
- Estudi de micronuclis



Metodes clonatge cel·lular



Dilució límit



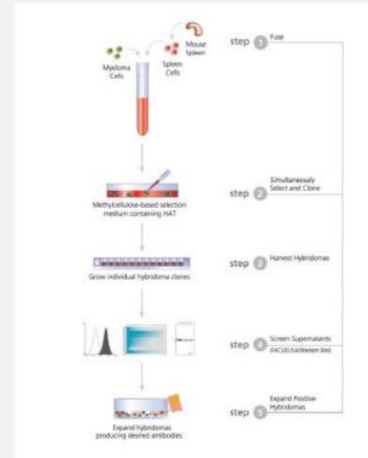
Plaques medi semisòlid



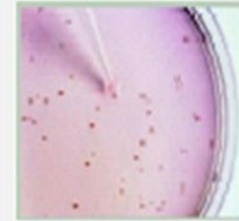
Cilindres



Chip glass



ClonaCell™-HY:



Plaques medi semisòlid