	<h2>Protocolo de ENSAYO DE HERIDA</h2>	<p>Rev. nº: 00</p> <p>11/02/2013</p> <p>Pág. 1 de 14</p>
---	--	--

El propósito de este protocolo es servir de ayuda o guía para quien quiera realizar ensayos de cierre de “herida”. Hemos puesto algunos datos concretos que se ajustan a nuestro equipo y que pueden no ser útiles si se realiza el experimento fuera del servicio.

1. INTRODUCCION.

El ensayo de cierre de “herida” (*wound healing assay*) tiene como objetivo el estudio de la migración celular. Es un ensayo fácil, barato y ampliamente utilizado por los investigadores.

Se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de células a la que previamente se le ha realizado una brecha o “herida”. Las células en el borde de la brecha se moverán hacia la abertura hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la “herida”.

Los pasos básicos implican la creación de la “herida” o área libre de células en la monocapa celular, la captura de imágenes de manera periódica durante el experimento y la comparación de todas las imágenes para determinar la velocidad de migración de las células.


Este experimento permite analizar tanto la migración de la monocapa como el movimiento de células individuales.

1.1. Ventajas:

- El ensayo se puede realizar en placas **multi-pocillo** convencionales (NUNC, FALCON). Esto es debido a que las imágenes se adquieren con objetivos de pocos aumentos (4x, 10x) para tener un campo que cubra toda la herida y estos objetivos permiten el enfoque placas convencionales.
- Las células se mueven hacia una dirección definida cerrando la “herida”, lo que facilita el análisis posterior de la **velocidad de la migración**.
- Se puede analizar la relación células/**matriz extracelular** y su participación en la migración celular ya que la superficie de ensayo se puede cubrir con diferentes tipos de matrices extracelulares.

1.2. Desventajas:

- El tamaño, forma y ancho de las “heridas” pueden variar entre pocillos del mismo ensayo, ya que generalmente se realizan las “heridas” de manera manual (Kam, Y et al. 2008).
- En algunas ocasiones es difícil asegurar que tanto los cultivos control como los grupos de tratamientos experimentales se realicen en **condiciones equivalentes de confluencia celular** (Staton, C.A. et al. 2009).

	Protocolo de ENSAYO DE HERIDA	Rev. nº: 00 11/02/2013 Pág. 2 de 14
---	--	---

- El proceso de rayar la monocapa puede **dañar la capa de matriz extracelular** subyacente, creándose un surco que impide la correcta migración hacia el centro de la “herida” (Kam, Y *et al.* 2008, Vogt, A. 2010)
- Los resultados se pueden ver comprometidos por la **liberación de factores** desde las células dañadas por el raspado al hacer la “herida” (Staton, C.A. *et al.* 2009)
- **No sustituye a los ensayos de quimiotaxis** ya que no se establece ningún gradiente de moléculas atrayentes.

2. Realización de ensayos de “herida” en el SEMOC

El equipo del centro, consta de un microscopio de fluorescencia invertido ObserverZ1, con cámara de incubación de metacrilato donde se controlan la humedad, los niveles de temperatura y porcentaje CO₂. La cámara *Cascade 1k (Photometrics)* es de alta resolución y monocroma. El software de adquisición es Axiovision 4.8 (Zeiss).

La adquisición de las imágenes es muy versátil. Puede adquirir imágenes en diferentes posiciones (**multi-posición**) dentro de la misma placa y/o dentro del mismo pocillo.

El equipo tomará imágenes en cada **intervalo de tiempo** durante un periodo total determinado por las necesidades del usuario, generalmente se adquieren imágenes cada 30 minutos o 1 hora durante un periodo de 24hr. Por las características del equipo no es necesario que los intervalos de tiempo sean constantes. Por ejemplo, se pueden adquirir imágenes cada hora durante las primeras 12 horas y aumentar el número a una imagen cada 30 minutos en las siguientes 12 horas.

Se pueden tomar imágenes de **campo claro y fluorescencia** de manera consecutiva en el mismo campo. Esta característica lo hace muy útil para poder estudiar el movimiento de células marcadas fluorescentemente en una población en la que no todas las células están marcadas, como en muestras transfectadas, uso de métodos de interferencia. Los filtros disponibles en este equipo son: UV (G 365 FT 395 BP445), Verde (BP 470/40 FT495 BP525/50), Rojo (BP 550/25 FT570 BP605/70), Rojo Lejano (BP 575-625 FT645 BP660-710)

Tenemos adaptadores para albergar placas **P35, P60, MW6, 12, 24** convencionales de NUNC o FALCON y las **MW8μ** de Ividi que tienen 8 pocillos y el fondo de plástico especial para microscopia (disponibles en SEMOC). Las únicas placas que no podemos usar son p100 o p150.

Generalmente se usan los objetivos **4x** y **10x**. El más usado es el 4x porque se ve una mayor franja de la “herida”, en él se observan las células con la técnica de campo claro. El objetivo de 10x permite adquisiciones mediante las técnicas de campo claro y **DIC** (*Differential Interference Contrast*). El de 4x únicamente permite adquirir imágenes en campo claro.

		Protocolo de ENSAYO DE HERIDA	Rev. nº: 00 11/02/2013 Pág. 3 de 14
--	--	--	---

3. **PROTOCOLO estándar ENSAYO “HERIDA”** (los parámetros que hemos puesto son nuestras sugerencias, dependiendo del tipo celular y experimento se requerirá una puesta a punto).
Cultivo celular.

Se cultivan las células hasta confluencia (**90% aprox**). El número concreto de células para crear una monocapa confluyente depende del tipo celular y se debe ajustar para cada caso. Si se usan diferentes tratamientos o mutantes se debe adaptar la densidad del cultivo con el fin de que todos los cultivos estén **confluentes al comienzo del experimento**.

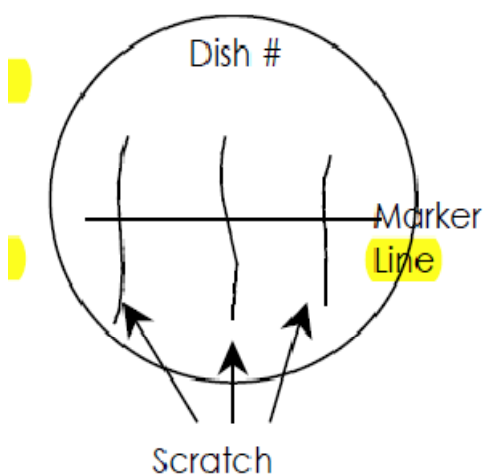
Recomendamos placas **Mw6** para tener más campo a la hora de elegir la zona de la “herida” o poder tomar varios campos en cada pocillo. Aunque es posible usar **Mw24** aumentando el número de condiciones disponibles en el experimento. Cuanto más grande sea el pocillo de la placa (Mw6>Mw8>Mw24) la manipulación será más fácil a la hora de realizar la “herida”, ésta será más larga y se podrán realizar varias “heridas” en el mismo pocillo para evitar zonas en las que esté defectuosa. Además, se podrían realizar varias adquisiciones del mismo pocillo (triplicados).

En diferentes artículos recomiendan realizar el ensayo en **condiciones de bajo suero**, que permita a las células migrar y no provoque muerte celular, pero que minimice la proliferación celular, ya que esta podría apantallar la migración celular. Este efecto es especialmente claro en aquellos ensayos en los que las células migran poco.

Realización de “herida” en la monocapa de células.

Se pueden realizar de manera manual o utilizando diferentes soportes comerciales.

Manual



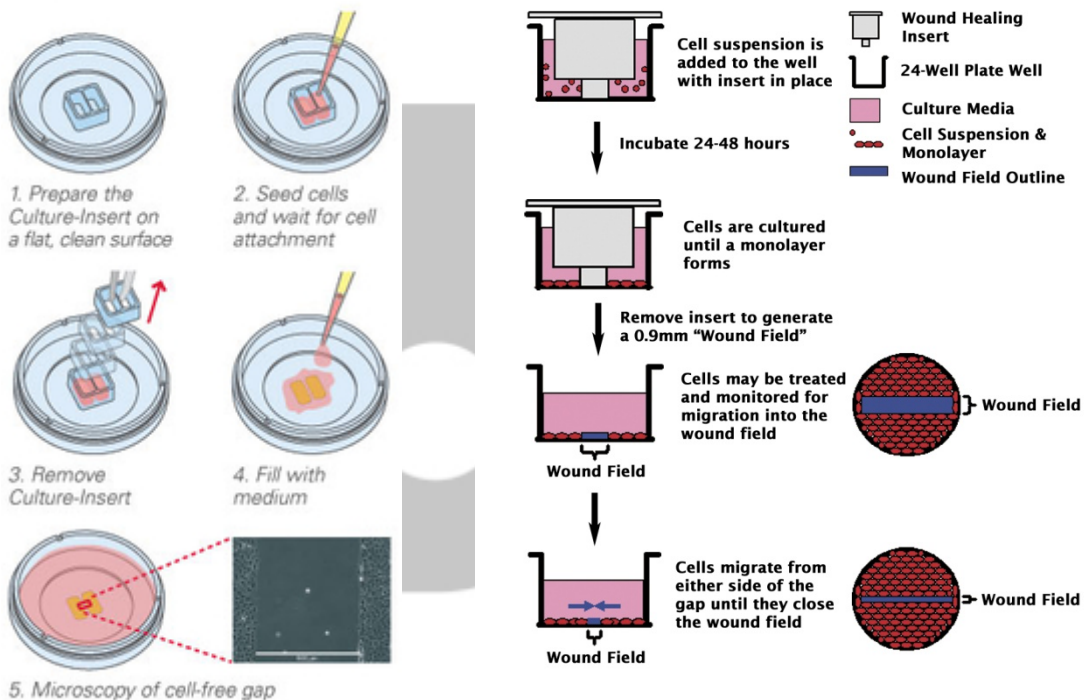
- Se recomienda hacer entre 1 y 3 “heridas” por pocillo según el tipo de placa elegida. La trayectoria puede ser **HORIZONTAL (-)** o **VERTICAL (I)**. Para ello se utilizarán puntas estériles amarillas (**P200, recomendable**). Se arrastrarán por la monocapa con un ángulo de inclinación de 30 grados (no perpendiculares a la placa) y guiándose con una regla flameada para hacerlo lo más recto posible. Podemos poner una hoja de papel debajo de la placa de tal forma que el borde de papel determine una línea base perpendicular a las “heridas”, para hacerlas lo más paralelas posibles. En el caso de tener una matriz en la placa (colágeno, fibronectina), no apretar mucho con la punta con el fin de no dañarla.

- Importante, lavar dos veces la placa con PBS para descartar los restos celulares desprendidos de la zona de “herida”.
- Agregar medio nuevo con o sin tratamiento.

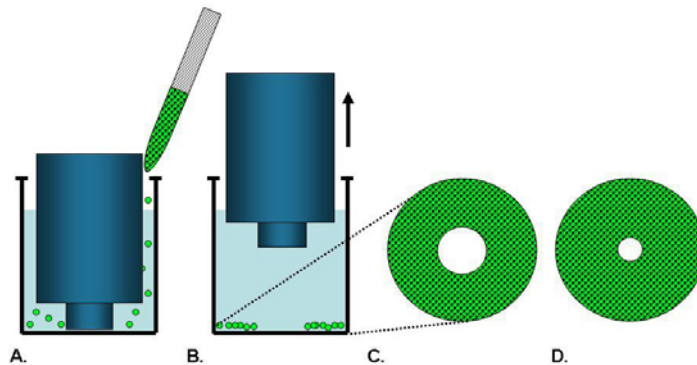
Otros soportes disponibles en el mercado.

- Sistema Ibidi (<http://ibidi.com/applications/wound-healing-and-migration/handling-of-culture-inserts/> y <http://ibidi.com/support/movies/mv16/>) en la izquierda (UTILIZADO EN SEMOC) o Cell Biolabs en la derecha (<http://www.cellbiolabs.com/wound-healing-assays>)

Principle



- Cell Exclusion **Zone Assays** (Disponible en Platypus Technologies and Cell Biolabs. Platypus' Oris™ Cell Migration Assay) **NO UTILIZADO EN SEMOC**



4. APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS.

El equipo Cell Observer del SEMOC **no dispone de sistema de perfusión**, así que no se pueden realizar administraciones automáticas durante la adquisición. Algunos grupos tratan las células 24 horas antes de la “herida” y después de la “herida” añaden el mismo medio tratado. Otros tratan las células inmediatamente después de hacer la “herida” y antes de colocar la placa en el Cell Observer. Si se necesita realizar tratamientos durante el tiempo de adquisición es necesario que lo habléis con el personal del servicio para buscar el mejor modo de hacerlo.

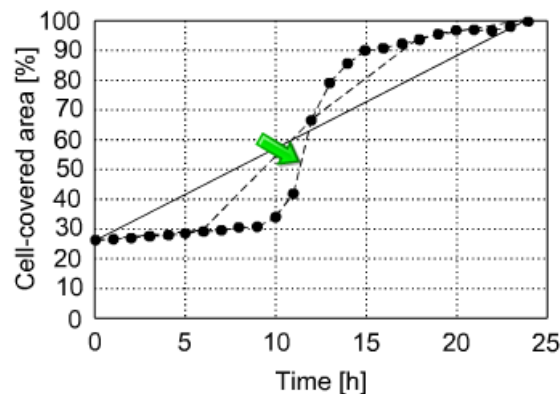
5. Adquisición de las imágenes

Se recomienda trabajar a bajos aumentos (4x) para tener un campo grande.

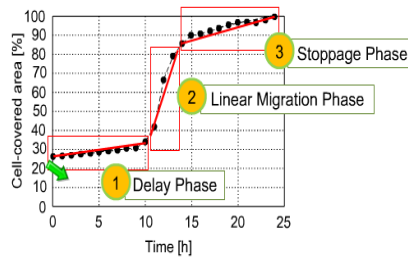
Para el análisis automático se recomienda enfocar ligeramente por encima del punto de foco ya que los algoritmos detectan mejor los bordes y es preferible dejar las imágenes un poco sobreiluminadas que tener imágenes oscuras.

La cantidad de imágenes adquiridas durante el experimento depende del objetivo y del conocimiento que tengamos de nuestras células y su comportamiento.

Existen principalmente tres tipos de adquisiciones o barridos: Barrido Rápido (—), Barrido de tiempos discretos (-----), Barrido continuo (•••••)



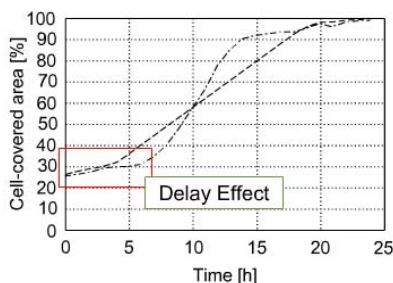
- **Barrido rápido:** dos tiempos por experimento (0h, 24h). Evalúa la migración celular general. No lo recomendamos porque pierdes mucha información y en el Cell Observer puedes adquirir imágenes cada poco tiempo.
- **Barrido de tiempos discretos:** cuatro tiempos por experimento (0h, 6h, 12h, 24h). Revela información básica acerca de las fases del ensayo "herida".
- **Barrido continuo:** veinticinco tiempos (adquisiciones cada hora desde 0 a 24h por experimento). Muestra detalles del análisis de las fases inicial (*Delay Phase*), central (*Linear Migration Phase*), y tardía de la migración (*Stoppage Phase*).



Key Area of Interest → 2 Linear Migration Phase

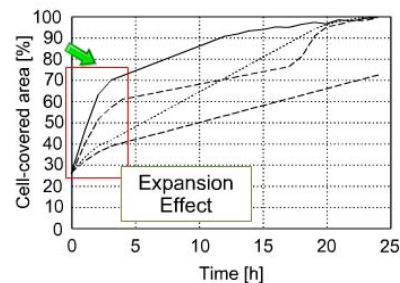
El barrido continuo es el más usado por los usuarios ya que te permite elegir las mejores fotos para las presentaciones o artículos, también es útil para obtener informaciones relativas a efectos de retraso o expansión de la migración independientes de los distintos tratamientos o variables experimentales (Ver grafica siguiente)

Initial phase varies but stoppage phase is observable at almost every experiment



Possible reasons for delay effect:

- Low cell density
- Coating with serum proteins needed for adhesion
- Coating with cell segregated proteins



Possible reasons for expansion effect:

- High cell density
- ...

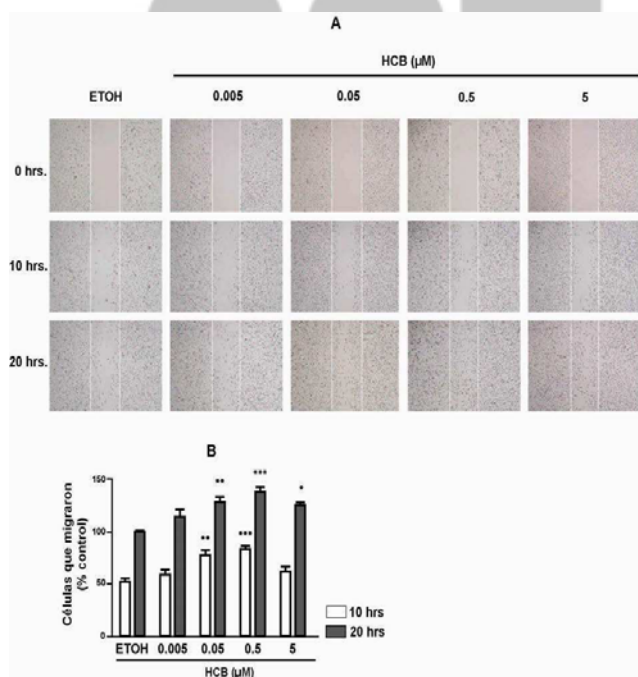
En algunas ocasiones cuando se necesita analizar con **detalle el movimiento** de cada célula se acorta el tiempo entre imágenes hasta 15 minutos. Estos archivos tienen mucha información que a veces no es necesaria y ocupan mucho espacio.

6. ANALISIS

Existen diferentes modos de analizar estos ensayos. A continuación resumimos los más comunes:

6.1. Contaje del número de células que migran

Se toman fotografías a diferentes tiempos después de realizada la “herida” (ejemplo: tiempo 0, 6, 12 y 24 horas). Se cuenta el número de células que migraron dentro del área de la “herida”, seleccionando varios campos al azar. Se representan los datos en el gráfico expresando el valor promedio de células migrantes en cada tiempo y para los diferentes tratamientos. En el ejemplo que mostramos a continuación se asignó un valor arbitrario de 100 a la muestra control del tiempo de 20 hrs.



Acción del HCB sobre la migración celular evaluada por el ensayo de la “herida” en MDA-MB-231. (A) Fotos representativas de las “herida” s realizadas en los pocillos con los diferentes tratamientos [HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 μM) ó vehículo], y en los diferentes tiempos (0, 10 y 20 horas); y (B) cuantificación del número de células que migraron hacia la “herida” . Se tomaron imágenes en cinco campos elegidos al azar, en los diferentes tiempos. Se contaron el número de células que migraron hacia la “herida” . Se asignó un valor arbitrario de 100 a la muestra control del tiempo 20 hrs. Los valores son las medias± SD. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*p< 0.05; **p<0.01, ***p< 0.001).

6.2. Medición del área de la “herida”

Se puede realizar con varios programas disponibles en la red. Aquí seleccionamos dos por ser gratuitos y fáciles de usar.

- **Programa TScratch**

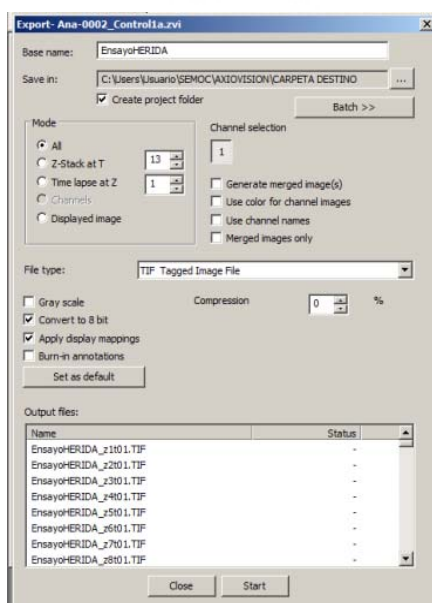
http://www.cse-lab.ethz.ch/index.php?&option=com_content&view=article&id=363&catid=49. Tenemos el manual disponible para enviároslo, pero hacemos un resumen a continuación.

Mediante este software (Gebäck T *et al.* 2009) se calcula el porcentaje del área de “herida” que queda sin cerrar. El programa es de fácil manejo y completamente automático, se pueden analizar tanto imágenes sueltas como imágenes agrupadas según sus tiempos de adquisición y sus condiciones.

En este segundo caso, es necesario colocar las imágenes en subcarpetas como indicamos más adelante. El análisis de imágenes por carpetas implica el trabajo de agruparlas que puede ser tedioso, pero es muy útil ya que se obtienen de manera automática los datos comparativos de tratamientos vs control, imágenes con la “herida” perfilada, estadística e incluso gráfica.

En el análisis con imágenes sueltas, calcula el porcentaje de área de “herida” abierta, y se obtienen imágenes con la “herida” perfilada, útil para los montajes de los artículos. Los datos de estadística y comparativa entre condiciones los tenéis que hacer vosotros.

Una vez adquiridas las imágenes en el Cell Observer, el *archivo* .ZVI se exporta a archivos TIFF en el programa Axiovision de la siguiente manera (lo tenemos instalado en la estación de trabajo pero os podéis descargar vosotros la versión gratuita):



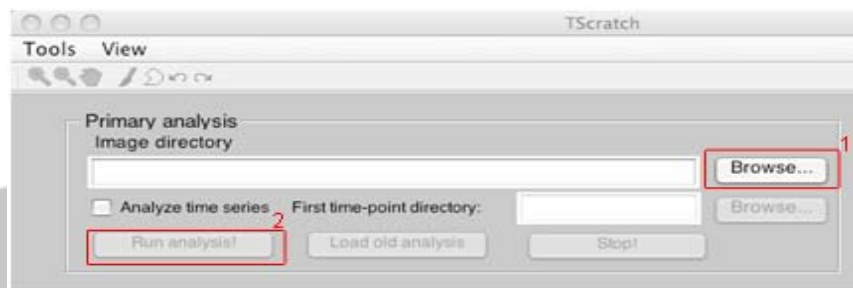
1. Se abre el *archivo* en *File/Open*.
2. En el directorio *File/Export* aparece la ventana para exportar.
3. Seleccionar la carpeta donde se quieren guardar las imágenes exportadas (*Save in ...*).
4. En apartado *Mode* seleccionar *All*. En el apartado *Chanell selection* deseleccionar todo. En tipo de formato (*File Type*) seleccionar TIF, 0% de compresión y convertir a 8bit.
5. Presionar *Star*.

6. Comprobar que se han guardado bien las imágenes en las carpetas.

Abrir el programa **TScratch**.

Como ya tenemos el experimento desglosado en los distintos fotogramas en formato TIFF se puede proceder de dos formas distintas:

Single directory mode, analizará de manera individual cada *fotograma* correspondiente a cada muestra, y nos dará para cada tiempo el porcentaje de área sin células en esa imagen.



Clic *Browse* y selecciona la carpeta donde tengas las imágenes sueltas (1).

Clic el botón “*Run analysis*” (2) para seguir.

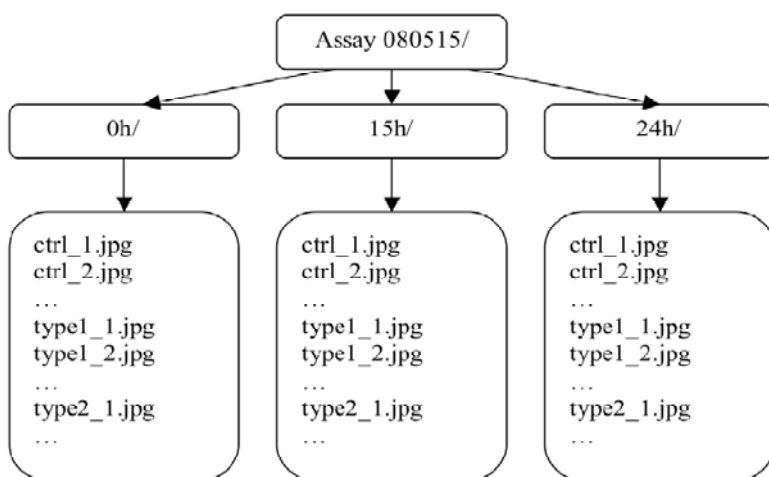
Multiple directory mode

De esta manera se analizan a la vez todas las imágenes de las distintas muestras o condiciones y de los diferentes tiempos. Para ello, desglosamos el archivo .zvi en los distintos fotogramas en formato TIFF como hemos indicado arriba. Posteriormente crearemos una carpeta general que englobe tantas subcarpetas como tiempos a analizar (0h.....24h) e incluimos en las distintas carpetas los archivos **jpg** o **tif** de todas las condiciones y triplicados si los tenemos. En este punto es muy importante la nomenclatura.

La identificación de las imágenes para comparar está basada en los nombres del archivo de las imágenes. Un ejemplo se muestra en la figura siguiente. Deben coincidir los nombres de todos los puntos de tiempo. Por ejemplo, un archivo llamado ctrl_1.jpg en el punto de 24hr coincide con el archivo ctrl_1.jpg en el punto inicial "0h", y el porcentaje de área de la “herida” abierta se calcula utilizando las áreas calculadas para estas dos imágenes. No se distingue entre mayúsculas y minúsculas, pero todos los caracteres del archivo menos la extensión tienen que coincidir (las extensiones de archivo pueden ser diferentes y, por tanto, los formatos de archivo podría ser utilizado para las dos imágenes).

Para las imágenes de los grupos utilizados para el análisis estadístico, sólo se considera el nombre hasta el primer guion '_' o espacio o punto de carácter que separa la extensión. Por lo

tanto, las imágenes llamadas "ctrl_1.jpg", "ctrl_2.jpg" y "ctrl_3.jpg" se pondrán en el mismo grupo (llamado "ctrl"), mientras que "Treated_1.jpg" y "ctr_1.jpg" no. Todas las letras tienen que coincidir hasta el primer subrayado o en el espacio; todos los caracteres siguientes son ignorados y pueden ser cualquier número de espacios y guiones bajos.



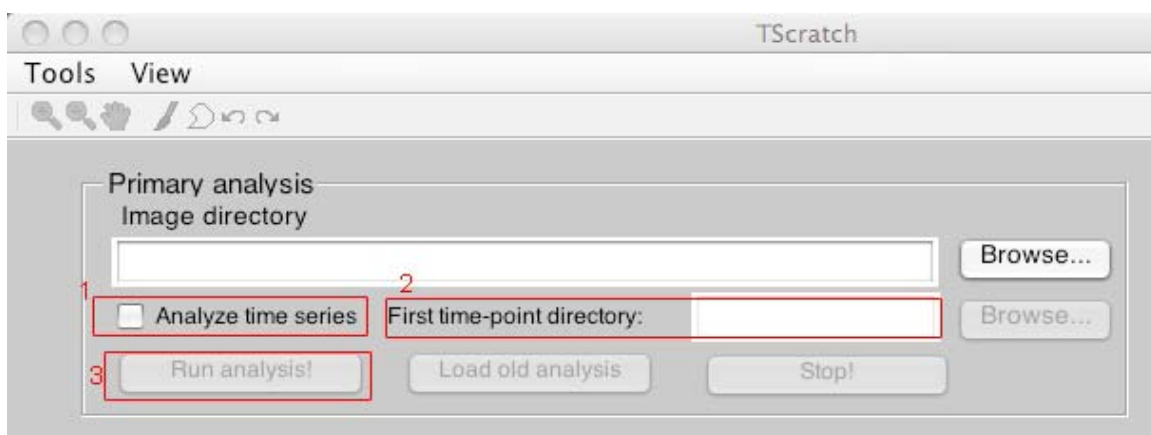
Carpeta general del exp.





Subcarpetas de tiempos

Imágenes separadas por tiempos, deben llamarse igual las imágenes de la misma "herida", y tener el mismo prefijo aquellas que quieras analizar en el mismo grupo estadístico.

Selecciona *Browse* en la parte de Primary Analysis y selecciona la carpeta donde tengas las imágenes.

Para analizar a la vez todas las condiciones del experimento, es necesario marcar el recuadro que precede a "Analyze time series" (1), y posteriormente hacer clic sobre el otro botón *Browse* que está próximo al cuadro llamado "First time-point directory" (2) donde se seleccionará la subcarpeta que contiene las imágenes correspondientes al tiempo inicial a analizar (Ejemplo 0h). Pulsar en Run Analyze para continuar (3).



 	 	Protocolo de ENSAYO DE HERIDA	Rev. nº: 00 11/02/2013 Pág. 11 de 14
--	--	--	--

A continuación se podrán modificar los valores umbrales sobre los cuales se realizará la medición del área que se va a cuantificar. Al variar este valor se incrementa o disminuye el área de “herida” abierta marcada por el algoritmo. Haciendo clic en Reset se vuelve al valor inicial. Se excluyen imágenes seleccionando el recuadro debajo del botón Reset.

El programa usa un algoritmo para obtener un umbral estimado y va a clasificar las imágenes en función de si se ajustan a su algoritmo o no. Por ello, el ajuste del umbral se realizará de dos maneras.

Primero aparecerá la pantalla de Group Editing Mode. En ella se puede modificar el valor umbral de aquellas imágenes en las que el programa es capaz de obtener el umbral de manera automática.

Para continuar el proceso tanto si hemos hecho modificaciones como si no, habrá que pulsar el botón de DONE en el apartado “review analysis” arriba a la derecha.

A continuación aparecerá la pantalla de Single Image Mode, en la que se puede modificar el valor umbral de aquellas imágenes en las que por diferentes motivos el algoritmo no ha dado un resultado válido. Se podrá modificar cada imagen por separado.

Para continuar el proceso tanto si hemos hecho modificaciones como si no, habrá que pulsar el botón de DONE en el apartado “review analysis” arriba a la derecha.

En este punto el programa nos pedirá el directorio donde queremos guardar los resultados.


Los resultados aparecen en una carpeta llamada “Analyzed” donde estarán los datos e imágenes analizadas. Se guardará un archivo txt con los datos globales de todas las imágenes seleccionadas, pudiéndose abrir con Excel, para posteriores cálculos.

- **Herramienta para el ImageJ:** *MRI Wound Healing Tool*.

La herramienta *MRI Wound Healing Tool* mide el área de la “herida” en los distintos fotogramas que componen el *time-series*.

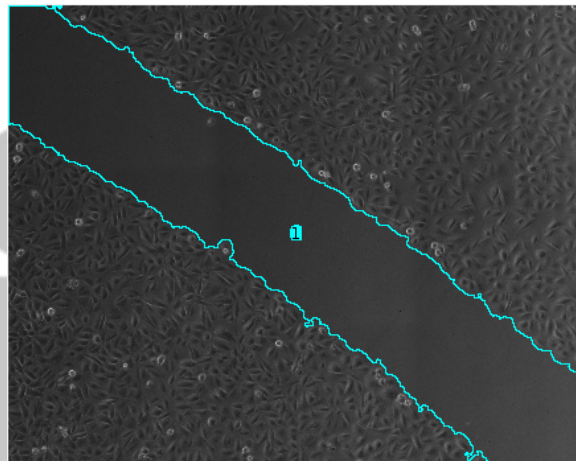
Para instalar la herramienta, acceder a la página web http://dev.mri.cnrs.fr/wiki/imagej-macros/Wound_Healing_Tool donde aparecerá un manual de instalación y manejo del programa. Los pasos de instalación y manejo a seguir serán:

1. Hacer un clic sobre el link [MRI_Wound_Healing_Tool.txt](#) y sin soltar el botón arrastrar el link sobre la ventana de *ImageJ*, que previamente tendré que abrir.
2. Aparecerá una ventana con información y un macro que salvaré mediante *File/Save as* en la carpeta *ImageJ/macros/toolsetsk* (Es posible que la carpeta *ImageJ*, este en *C:/Archivos de programas*)

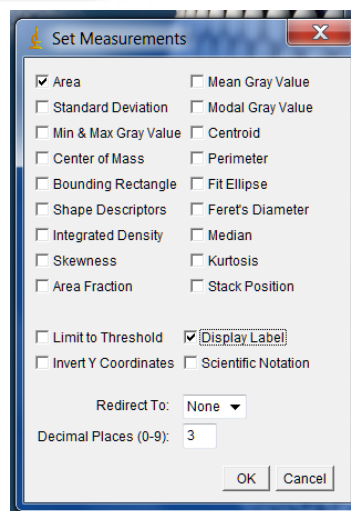
3. Para completar la instalación, reiniciar ImageJ, y en la ventana de *ImageJ* presionar el botón de la esquina inferior izquierda con el símbolo  seleccionando el *toolset* “MRI Wound Healing Tool”. Aparecerán dos botones el primero abre la pagina de ayuda y el segundo ejecuta el macro y realiza las medidas.



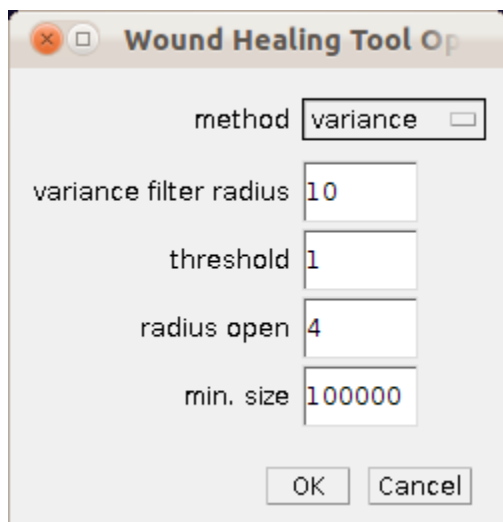
4. La instalación ya está completa. Para empezar a analizar el experimento lo abrimos en el *ImageJ* mediante *File/Open*. Si está en formato ZVI lo pasamos a TIFF mediante *File/Save as* y elegimos Tiff. Si lo analizamos en formato ZVI, hará bien las mediciones pero no nos mostrara las imágenes con el borde de la “herida” resaltado, muy útiles para los montajes posteriores.



5. Antes de accionar esta macro debemos seleccionar los parámetros área y *Display label* en el menú *Analyze/Set Measurements* de la barra principal del Image J para obtener los resultados que esperamos.



6. Al hacer clic con el botón derecho del ratón sobre el icono **m** se abre el menú siguiente:



method: Se puede elegir entre el método basado en la varianza (*variance*) y el método basado en encontrar los bordes (*find edges*). Para el segundo método, los parámetros *variance-filter-radius* y *threshold* no se tienen en cuenta.

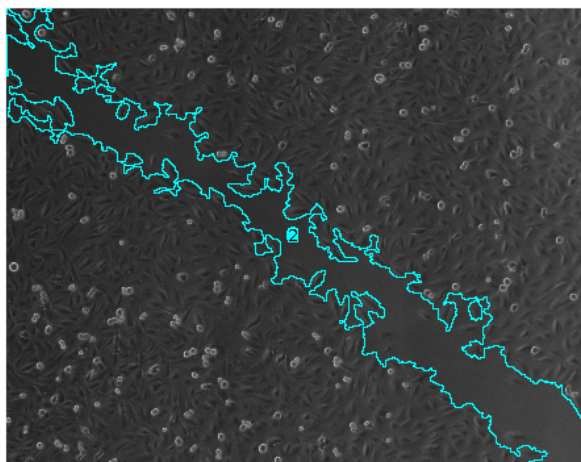
variance filter radius: Es el radio del filtro de varianza que se aplica para separar la zona que contiene células de la zona vacía. El radio debe ser lo suficientemente grande como para que la variación debida a la existencia de células desempeñe un papel importante en comparación con la varianza del ruido en la imagen. El tiempo de cálculo se hace más largo con un radio mayor.

Threshold: La imagen resultante del filtro de varianza se convierte en una máscara mediante la aplicación del umbral dado (*threshold*).

Radius open: Esta operación va a cerrar los agujeros en la monocapa celular. Debe ser lo suficientemente grande como para cerrar pequeños agujeros pero lo suficientemente pequeño como para no cerrar el área de la “herida” en las imágenes posteriores.

Min. Size: El tamaño mínimo de la “herida” que se tiene en cuenta. Esto excluye los pequeños orificios que aparecen en la monocapa.

7. Una vez elegido el método y ajustados los parámetros, se hace clic con el botón izquierdo sobre el icono **m** y automáticamente se ejecuta la macro y se muestran los resultados.
8. Por un lado aparecen las imágenes con el borde delimitado, y por otra una tabla de resultados con el área que queda vacía en cada tiempo.



Label	Area
1 wound healing.tif:0001-0004-1390:wound healing-1	2907885
2 wound healing.tif:0002-0005-1390:wound healing-2	1406758
3 wound healing.tif:0003-0006-1390:wound healing-3	1406758

Inconveniente: Puede suceder que el resultado en un tiempo de más de un área, porque ya estén en contacto algunas células de ambos lados. Estos casos se reconocen porque tienen el mismo número en la primera columna de la tabla de resultados.

Para obtener el área total de este tiempo sería necesario sumar todas las áreas obtenidas para ese punto

7.REFERENCIAS.

Kam, Y.; Guess, C.; Estrada, L.; Weidow, B.; Quaranta, V. A novel circular invasion assay mimics in vivo invasive behavior of cancer cell lines and distinguishes single-cell motility in vitro. *BMC Cancer* 2008, 8, 198.

Staton, C.A.; Reed, M.W.R.; Brown, N.J. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int. J. Exp. Path.* 2009, 90, 195-221.30

Vogt, A. Advances in two-dimensional cell migration assay technologies. *Eur. Pharm. Rev.* 2010, 5, 26-29

Gebäck T, Schulz MM, Koumoutsakos P, Detmar M. "TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays". *Biotechniques.* 2009 Apr;46(4):265-74.