

## PRÁCTICA IV.3

### ENSAYO DE FORMACION DE COLONIAS PARA DETERMINAR EFECTO DE EXTRACTO, FRACCIONES O SUSTANCIAS SOBRE CICLO CELULAR

### *COLONY-FORMING ASSAY TO DETERMINE THE EFFECT OF EXTRACTS, FRACTIONS, OR PURE SUBSTANCES ON THE CELL CYCLE*

**Clemencia de Castro de Pardo**

*Facultad de Medicina, Fundación Universitaria San Martín, Bogotá, Colombia.*

E-mail: [cdepardo@sanmartin.edu.co](mailto:cdepardo@sanmartin.edu.co)

## Propósito

Determinar el efecto de extractos, sustancias ó moléculas sobre el ciclo celular.

## Formación de colonias.

El ensayo de sobrevivencia clonogénico o ensayo de formación de colonias, se utiliza desde hace varias décadas, para evaluar efectos de radiación, quimioterapia, desarrollo de drogas, tamizaje de drogas, toxicología y en farmacología; presenta diversas variaciones en su técnica (crecimiento sobre agar suave, superficies sólidas como cajas de Petri, o en matrices semisolidas de metil celulosa), pero su objeto sigue siendo el mismo: evaluar si una célula es capaz de dividirse y formar una colonia, luego de haber sido expuesta a un tratamiento.

Esta técnica es considerada una herramienta de gran utilidad por sus ventajas de bajo costo, reproducibilidad, sencillez, y rapidez para la selección de nuevos agentes quimioterapéuticos; además, demuestra una buena correlación con ensayos de viabilidad como el de MTT para tamizajes a escala moderada .

## Materiales

- Material vivo

Líneas celulares tumorales  
Cultivos primarios de tejido sano.

- Extractos, sustancias ó moléculas a probar.

- Soluciones y reactivos.

Dimetil Sulfoóxido al 0.2 %  
Medio de cultivo  
Tripsina EDTA

Suero fetal bovino  
 Penicilina-Streptomina  
 Cristal violeta 1 % en etanol

- Equipos.

Cabina de flujo laminar  
 Incubadora a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>  
 Centrífuga  
 Micropipetas  
 Microscopio invertido

- Otros

Cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>  
 Pipetas de vidrio

## Metodología.

- Utilizando tripsina EDTA disociar las células y resuspenderlas en medio de cultivo suplementado (10 % de Suero fetal bovino y antibiótico)
- Sembrar en las cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. 100-200 células en 5 mL de medio suplementado. Esta cantidad depende de la capacidad de clonación de cada tipo celular.
- Se incuban a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para permitir su adherencia.
- Se prepara el extracto, fracción o sustancia en DMSO (0.2 %, concentración no tóxica).
- Se añade la sustancia problema en la concentración deseada por caja.
- Se incuban a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para permitir que la sustancia actúe en todas las células en caso de que su acción sea sobre una fase específica del ciclo.
- Se descarta el medio
- Se colocan 5 mL de medio suplementado por caja
- Se incuban a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> por 14 días
- Se descarta el medio
- Se colocan 2 mL de Cristal Violeta al 1 % en etanol por 15 minutos
- Se descarta el colorante.
- Se observa al microscopio invertido haciendo un recuento de las colonias.
- Se considera que los clones de más de 50 células no fueron afectados por la sustancia analizada

Todos los ensayos se hacen por duplicado. Es necesario realizar controles negativos (células sin tratar), controles del diluyente (DMSO) y controles positivos utilizando una sustancia conocida

El resultado se expresa así:

Coeficiente de clonogenicidad =  $\frac{\text{\# de colonias (m\u00e1s de 50 \u00e9lulas)}}{\text{\# de colonias del control}} \times 100$  de cajas tratadas / # de colonias del control X 100



→ Colonias



**Control**

**Sustancia**

**Control Positivo**

## Bibliografía

Salmon S., Hamburger A. et al. Quantitation of differential sensitivity of human – tumor stem cells to anticancer drugs. The New England Journal of Medicine 1978; 298 (24): 1321–1327

Rubinstein I. V., Shoemaker R., et al. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. Journal of the National Cancer Institute 1990; 82 (13): 1113–1118.

Kawada K., Yonei T., et al. Comparison of chemosensitivity test: clonogenic assay versus MTT assay. Acta médica Okayama 2002; 56 (3): 129–134.

Fedier A., Moawad A., Haller U., Fink D. P 53 –deficient cells display increased sensitivity to anthracyclines alter loss of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinasa. International journal of oncology. 2003; 23 : 1431–1437.

### **Clemencia de Castro de Pardo**

*cdepardo@sanmartin.edu.co*

El trabajo en los laboratorios de Medicinal Chemistry debe mantener altos estándares de precaución y buen uso.

El manejo de instrumental eléctrico, la utilización de calor, el material de cristal y los disolventes no presentan un especial problema, si se siguen las instrucciones del supervisor.

Este documento ha sido supervisado por el Prof. Clemencia de Castro de Pardo (*cdepardo@sanmartin.edu.co*) quien informa que no existen problemas específicos de seguridad en la realización de este ejercicio, incluyendo toxicidad, inflamabilidad y explosión, ni cualquier otro destacable, dentro de lo usual en un laboratorio de Medicinal Chemistry.

Se agradecerá comunicar al Editor cualquier posible incidencia.

## PRACTICE IV.3

### COLONY-FORMING ASSAY TO DETERMINE THE EFFECT OF EXTRACTS, FRACTIONS, OR PURE SUBSTANCES ON THE CELL CYCLE

Clemencia de Castro de Pardo

*Faculty of Medicine, Fundación Universitaria San Martín, Bogotá, Colombia*

E-mail: [cdepardo@sanmartin.edu.co](mailto:cdepardo@sanmartin.edu.co)

#### **Purpose of the assay**

To determine the effect of extracts, substances or any kind of molecules on the cell cycle.

#### **Colony-forming assay**

The colony-forming assay was used decades ago to evaluate the effects on living cells exposed to radiation, chemotherapy treatments, drug development, toxicology, pharmacology, etc. The test has many variations (growing on soft agar, on solid surfaces as for Petri dishes, on semisolid metal cellulose matrix), but the scope is in any case the same, to evaluate whether a given cell is able to reproduce itself and generate a cell colony, after being exposed to a certain treatment.

The assay is considered a very useful tool for selection of new chemotherapeutic agents, considering its low cost, simplicity, and short running time. In addition, it shows a good correlation with other viability assays as MTT.

#### **Materials**

- Living materials
  - Tumor cell lines culture
  - Primary normal cells culture
- Extracts, molecules, or substances to be tested
- Reagents and solutions
  - 0.2 % Dimethyl sulfoxide (DMSO)
  - Trypsin/EDTA
  - Fetal calf serum
  - Penicillin-streptomycin
  - Culture media
  - Violet crystal 1 % in ethanol
- Equipment

Laminar flow cabinet  
Cell incubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>)  
Centrifuge  
Micropipettes  
Inverted microscope

- Others

25 cm<sup>2</sup> T-flasks  
Glass pipettes

## Methodology

- Dissociate the cells using trypsin/EDTA, resuspend them in supplemented culture media (antibiotics plus 10 % fetal calf serum).
- Seed a 25 cm<sup>2</sup> T-flask with 100–200 cells in 5 ml of supplemented media. The amount of cells depends on the colony-forming capacity of each cell type.
- Incubate 24 h at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> to allow cell attachment.
- The sample (substance or extract to be analyzed) is prepared in DMSO 0.2 % (nontoxic concentration)
- Add to each flask the sample to be analyzed.
- Incubate 24 h at 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> to allow the substance act on all the cells, even in the case where it acts only in a specific phase of the cell cycle
- Discard the supernatant.
- Add 5 mL of supplemented media per T-flask.
- Incubate the cells 14 days at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>.
- Discard the supernatant.
- Add 2 mL of violet crystal solution 1 % in ethanol and allow the cells stand up for about 10 min.
- Discard the supernatant.
- Count colonies under the microscope.
- Each clone that has more than 50 cells is considered unaffected by the sample.

Each assay must be performed twice. Negative controls (untreated cells), solvent control (DMSO) and positive controls (a known toxic substance), must be undertaken as well.

The result is expressed as follows:

Colony-forming coefficient = number of colonies (50 cells or more) in the sample flask / number of colonies in the control flask × 100.



→ Cell colonies



Control

Sample

Positive control

## Bibliography

Salmon S., Hamburger A. et al. Quantitation of differential sensitivity of human – tumor stem cells to anticancer drugs. *New Engl. J. Med.* 1978; 298 (24): 1321–1327.

Rubinstein I. V, Shoemaker R et al. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.* 1990; 82 (13): 1113–1118.



Kawada K., Yonei T., et al. Comparison of chemosensitivity test: clonogenic assay versus MTT assay. *Acta Médica Okayama* 2002; 56 (3): 129–134.

Fedier A., Moawad A., Haller U., Fink D. P 53–deficient cells display increased sensitivity to anthracyclines alter loss of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinasa. *Int. J. Oncol.* 2003; 23: 1431–1437

**Clemencia de Castro de Pardo**

[cdepardo@sanmartin.edu.co](mailto:cdepardo@sanmartin.edu.co)

High standards in safety measures should be maintained in all work carried out in Medicinal Chemistry Laboratories.

The handling of electrical instruments, heating elements, glass materials, dissolvents and other inflammable materials does not present a problem if the supervisor's instructions are carefully followed.

This document has been supervised by Prof. Clemencia de Castro de Pardo ([cdepardo@sanmartin.edu.co](mailto:cdepardo@sanmartin.edu.co)) who has informed that no special risk (regarding toxicity, inflammability, explosions), outside of the standard risks pertaining to a Medicinal Chemistry laboratory exist when performing this exercise.

If your exercise involves any "special" risks, please inform the editor.