



ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO DE DIVERSOS COMPUESTOS EN LA MIGRACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS

Ponente: Pilar Gutiérrez López.

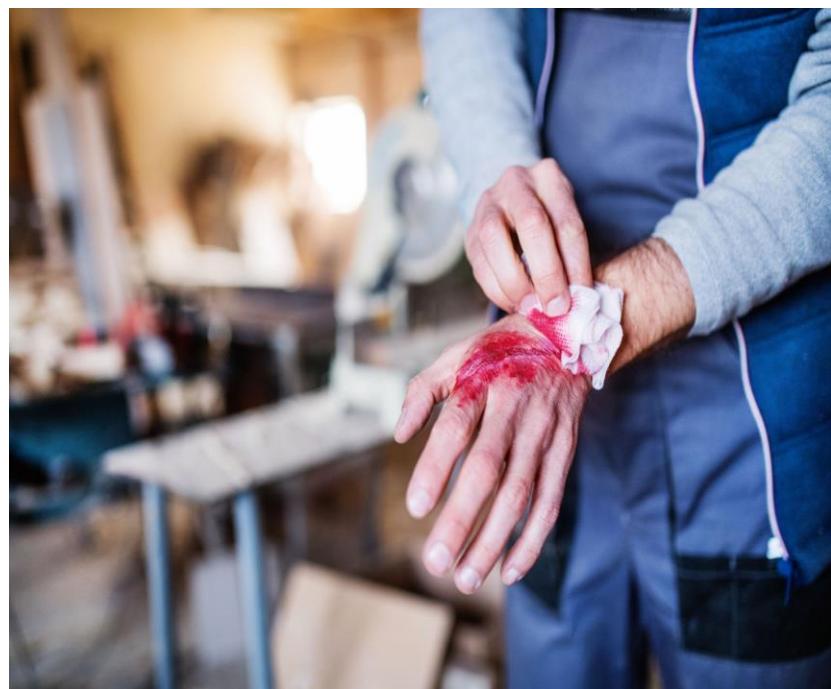
**Sicilia Zafra, A. G.², Gutiérrez López, M.P.¹, Arenas Córdoba,
R.¹, Santos Núñez, S.¹.**

¹ Alumnas del Máster de Especialización en Cultivos Celulares.

² Profesora Coordinadora del IES La Fuensanta.

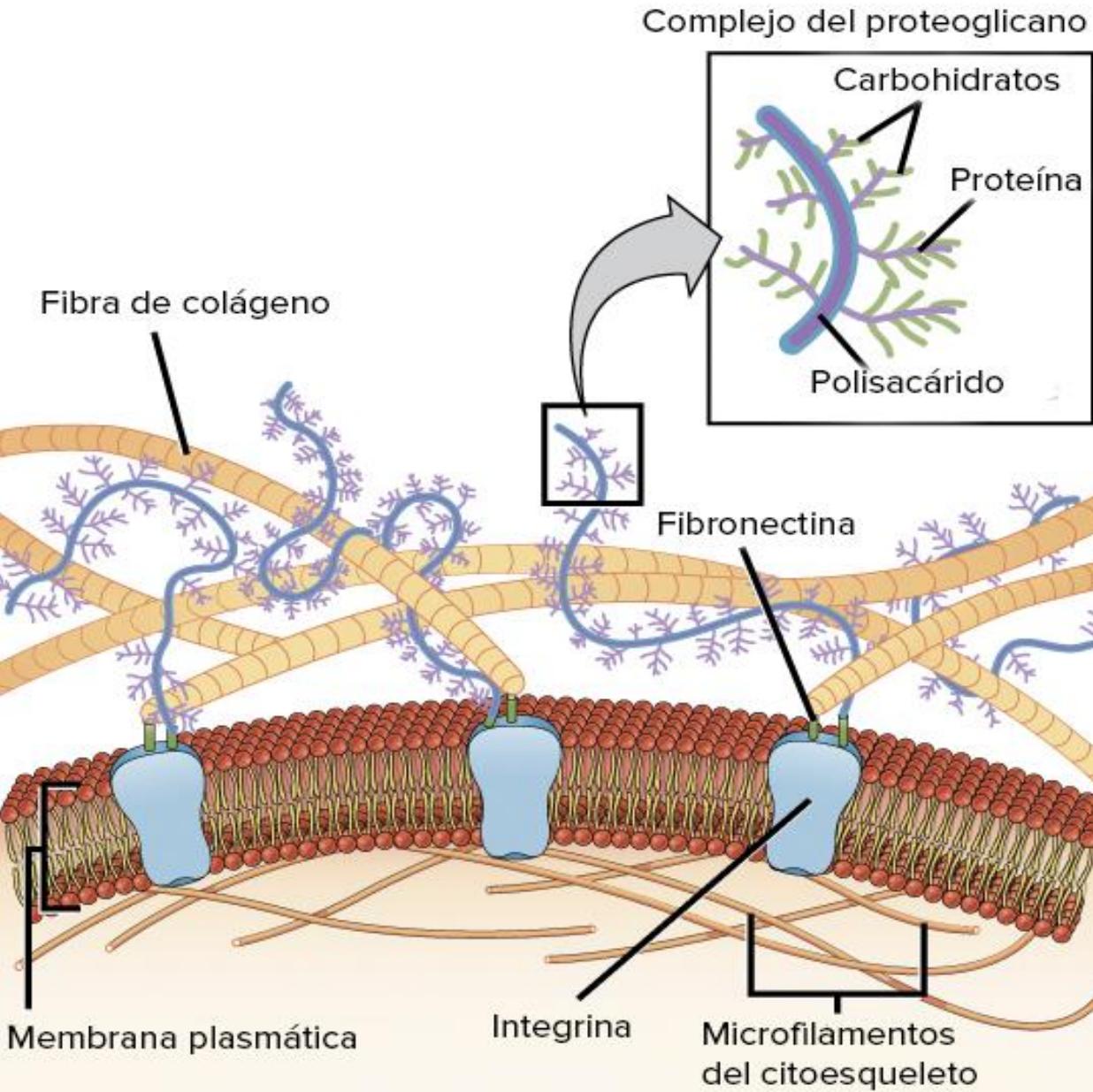
ÍNDICE

- ❖ **Introducción.**
- ❖ **Objetivos de la investigación.**
- ❖ **Fundamentos teóricos.**
- ❖ **Materiales y métodos.**
- ❖ **Diseño experimental**
- ❖ **Resultados**
- ❖ **Discusión**
- ❖ **Conclusiones.**
- ❖ **Agradecimientos.**
- ❖ **Bibliografía**



*¿Te has preguntado
qué ocurre cuándo te
haces una herida?*

IMPORTANCIA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR



La matriz extracelular participa en la señalización para la diferenciación, supervivencia, migración y proliferación y para mantener la homeostasis del tejido donde se encuentran.

Crédito de la imagen: OpenStax Biología

IMPORTANCIA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular está constituida por proteínas y carbohidratos , secretadas por las células, que rellenan el espacio intercelular.

Funciones de la matriz extracelular:

- *Adhesión de las células para formar tejidos.*
- *Mantiene la integridad y propiedades mecánicas de los tejidos:*
 - *resistencia*
 - *elasticidad*
 - *hidratación*
- *Mantiene la forma celular.*
- *Participa en la comunicación intercelular.*
- *Modula la diferenciación y la fisiología celular, entre otras .*

FIBROBLASTOS

- Dónde se encuentran.
- Cúal en su función.
- Qué producen.
- Misión.

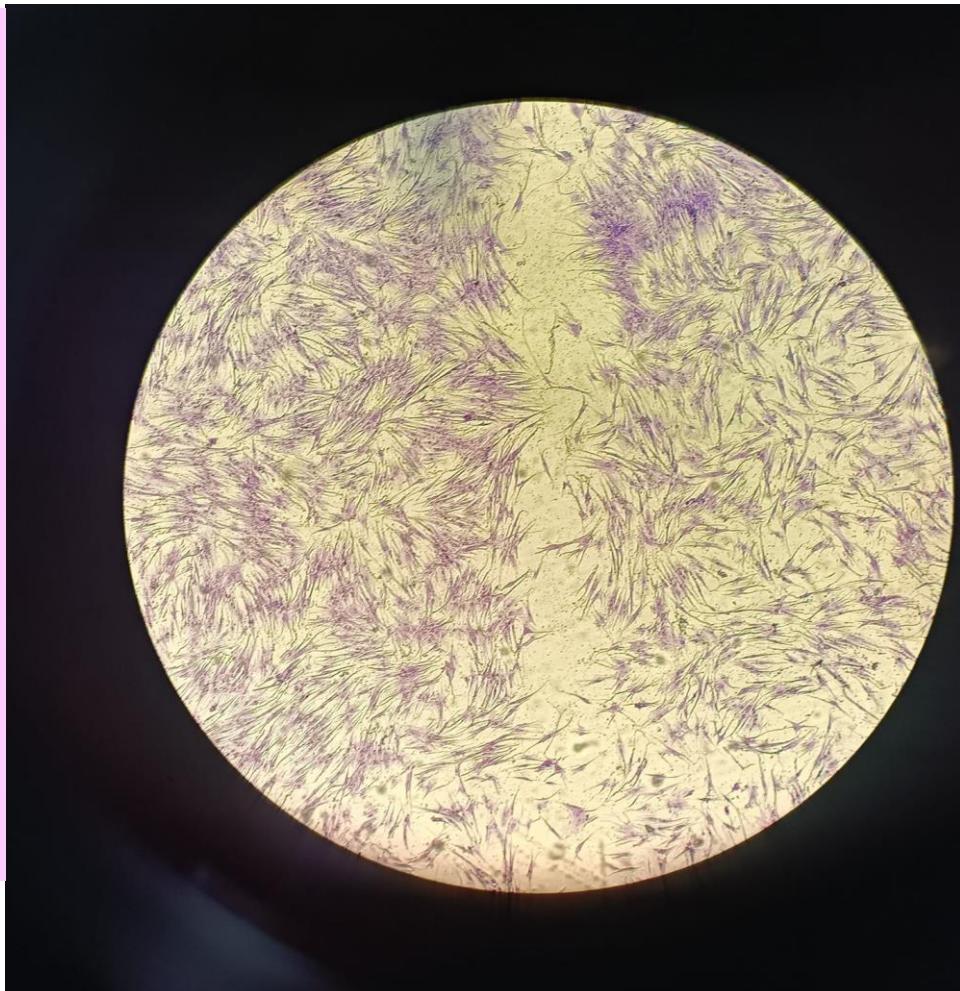


De SubtleGuest - slika uzeta sa engl. vikipedije [1], CC BY 2.5,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2903074>

<https://magazine.x115.it/wp-content/webp-express/webp-images/uploads/2021/02/fibroblasto-1536x1158.jpg.webp>

OBJETIVOS

- *Investigar la influencia de la concentración de las diferentes sustancias en la migración de los fibroblastos que son los reparadores naturales de los daños ocasionados en la piel.*



Materiales.

- EPI (guantes, bata, manguitos y mascarilla para la campana).
- Papel de filtro.
- Tubos Falcon de 15 ml y 50 ml estériles.
- Gradilla.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Pipeteador automático.
- Pipetas serológicas estériles.
- Micropipeta p1000.
- Puntas de micropipeta con filtro.
- Placa multipocillo de 24.
- Parafilm.
- Vaso de precipitados para eliminar las puntas.



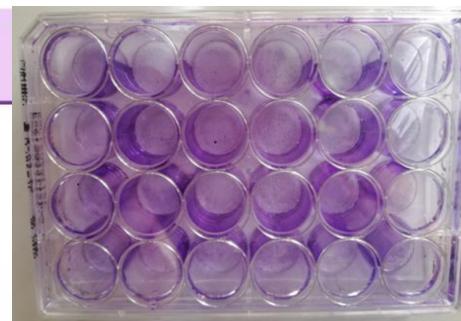
Equipos.

- Cabina de bioseguridad.
- Campana de extracción de gases.
- Baño termostático.
- Microscopio invertido.
- Incubador de CO₂



Reactivos.

- PBS 1X.
- Agua destilada.
- Alcohol de 70°.
- Lejía al 4%.
- Metanol.
- Tiroxina.
- Amoxicilina.
- Ácido hialurónico.
- Ácido fólico.
- Cristal violeta al 5% diluido en metanol al 25% (tinción).
- Medio de cultivo IMDM suplementado con: 50 ml de SFB (10%), 3 ml de penicilina-estreptomicina, 1 ml de fluconazol y 1 ml de gentamicina, como antimicoplasma.



MATERIALES Y MÉTODOS

ANTECEDENTES

Una de las técnicas más utilizadas para estudiar la migración celular es el **ensayo de cicatrización de heridas** (*wound healing assay*). Esta prueba permite analizar cómo las células se desplazan en respuesta a un espacio vacío creado artificialmente.

Este método es *muy utilizado en investigación biomédica* para estudiar:

- ❖ *La migración celular en condiciones normales y patológicas.*
- ❖ *Los efectos de fármacos que pueden promover o inhibir la migración celular.*
- ❖ *Procesos como la regeneración tisular y la metástasis en el cáncer.*

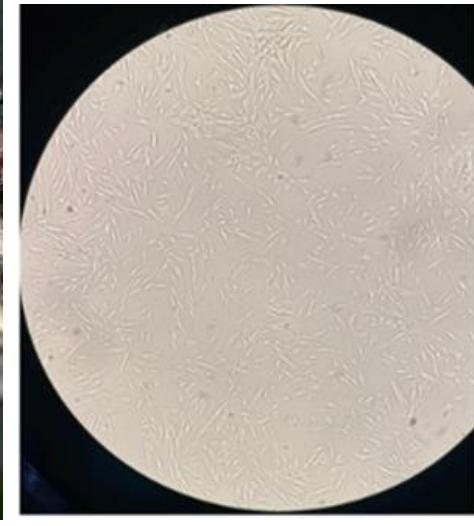
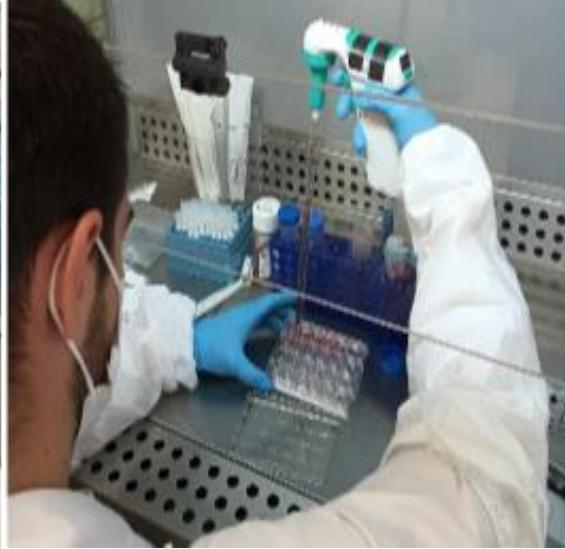
MATERIALES Y MÉTODOS

1. Se realiza un cultivo de una línea de **Fibroblastos Adultos Humanos (HAF) derivados de piel** en un **T25 con medio de cultivo específico suplementado con un 10 % de FBS y 5 ml de L-glutamina, penicilina, estreptomicina, fluconazol y gentamicina, para evitar la contaminación del medio.**
2. Cuando el cultivo alcanza un **80-85 % de confluencia**, se levanta las células con tripsina al 0,25 % y se hace un **recuento y % de viabilidad con azul tripán en cámara de Neubauer modificada.**

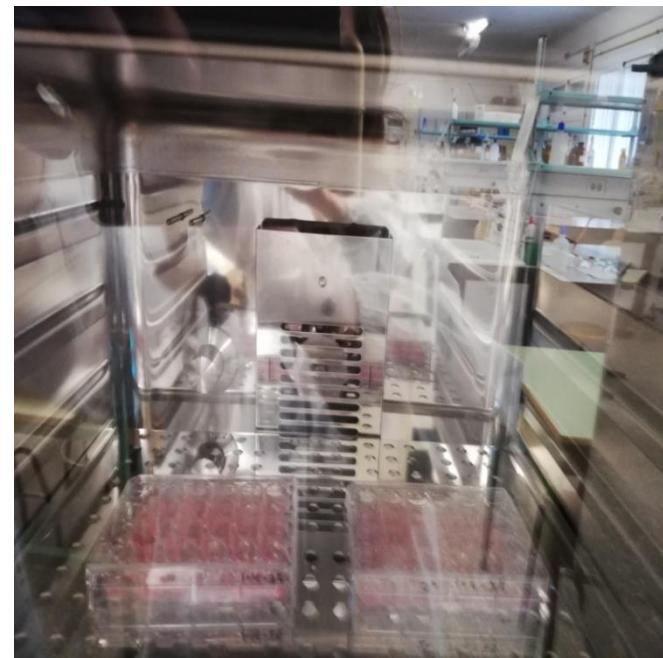
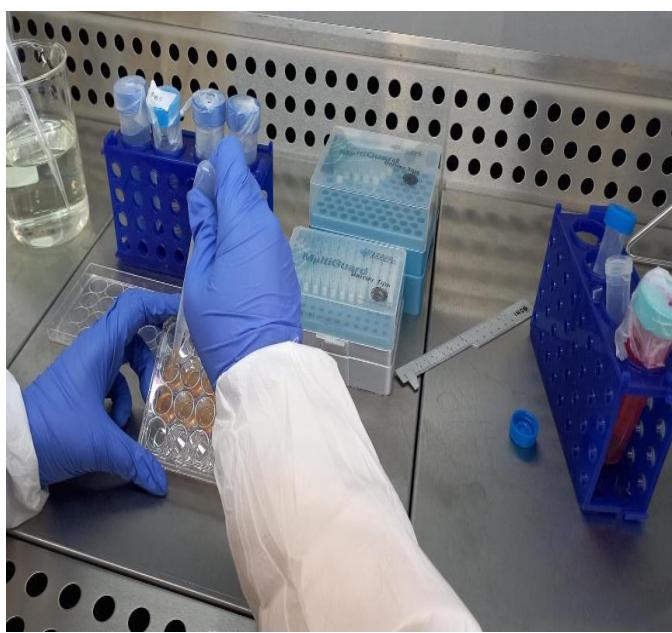
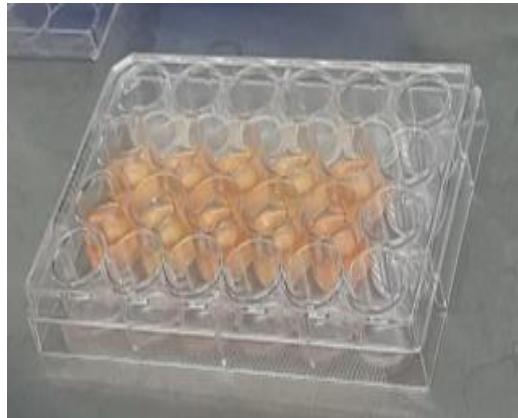


3. A partir del recuento se siembran dos *p24* con medio de cultivo específico y con % reducido de FBS, 5 ml de L-glutamina, penicilina, estreptomicina, fluconazol y gentamicina, para evitar la contaminación del medio.
Se siembran 2×10^4 células/pocillo.

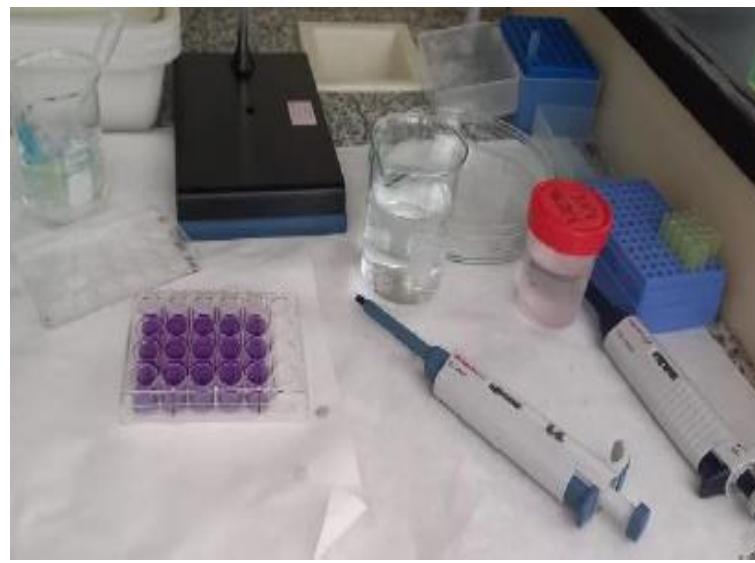
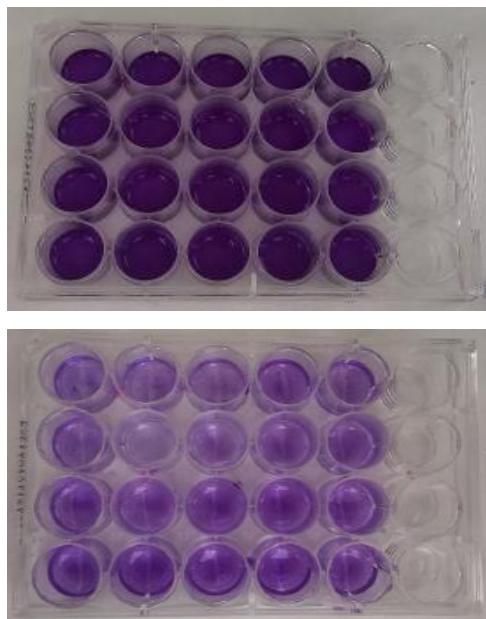
4. Tras un semana de incubación a 37°C, 5 % de CO₂ y 90 % de humedad, realizando cambio de medio a 24 horas y cada 3-4 días se llega a una **confluencia del 80 % aproximadamente**.

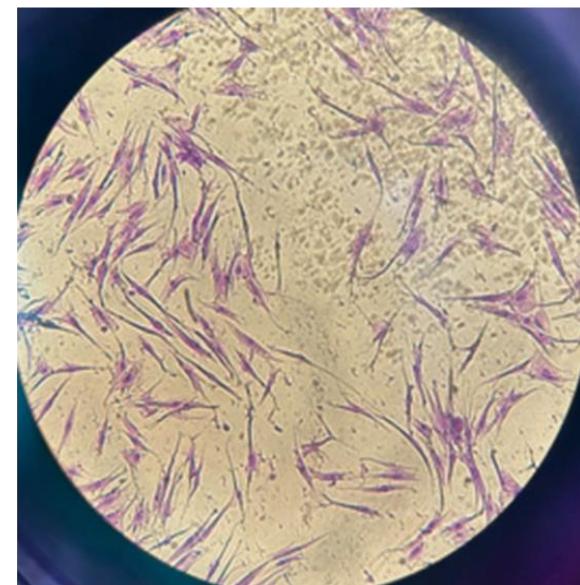
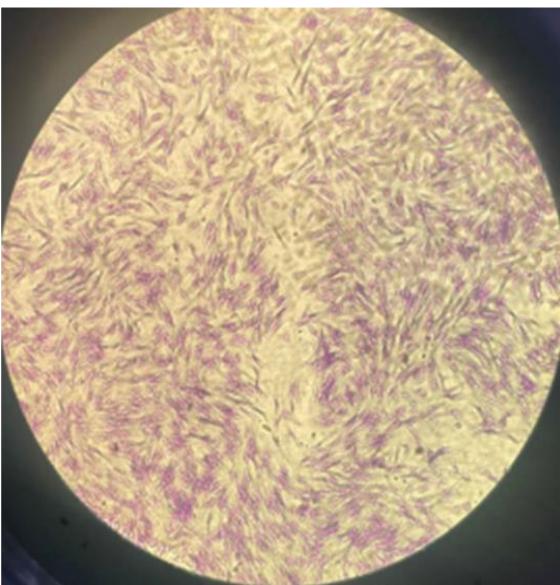
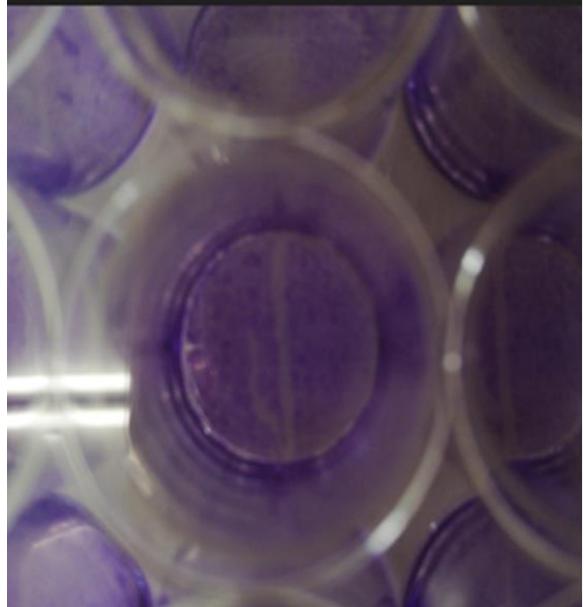
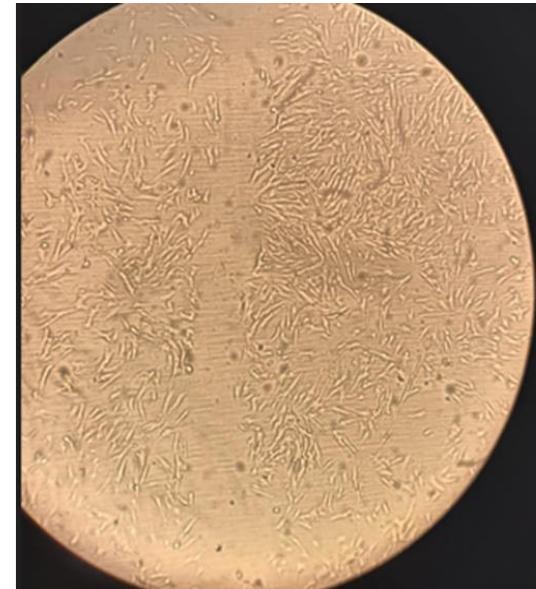
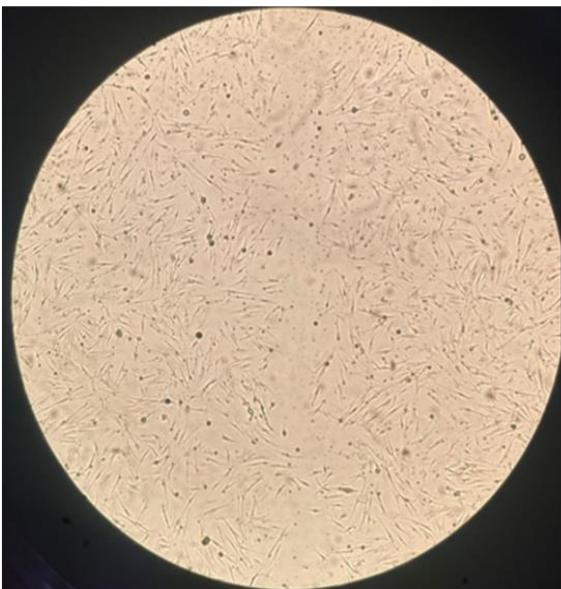


5. Se realiza una '**herida**' en cada pocillo de la placa con una punta amarilla estéril. Se realizan dos lavados con DPBS, se añade el medio de cultivo y los compuestos a ensayar a distintas concentraciones.
6. Se incuba **24 horas a 37°C, 5 % de CO₂ y 90 % de humedad**.



6. Se retira el medio de cultivo, se fijan las células con metanol y se tiñen con *cristal violeta al 0,5 %*.
7. Se realiza *la toma de imágenes al microscopio con cámara digital* que permite medir la anchura entre los bordes de la herida y comparar los resultados obtenidos en los pocillos.





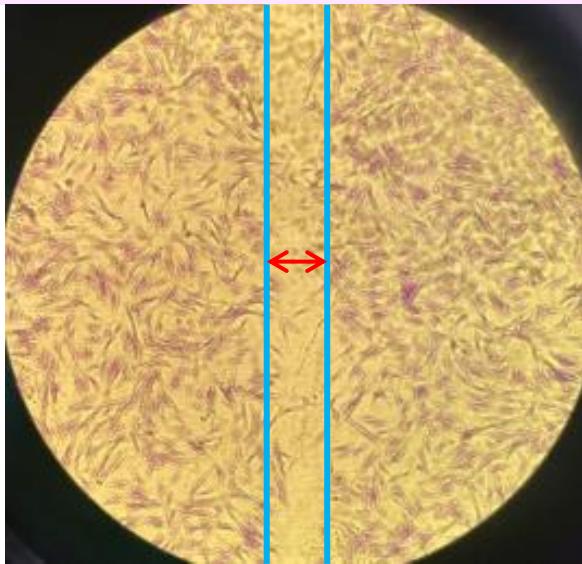
VARIABLES DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES

Las variables dependientes que se midieron fueron **la anchura de la brecha** en el cultivo celular antes y después de la incubación con los productos en estudio, el **número de células individuales y en grupo** que se desplazan para cerrar la herida.

Las variables independientes fueron las diferentes **concentraciones** utilizadas en el ensayo para incubar con el cultivo celular.

	Control	Pocillo 1	Pocillo 2	pocillo 3	Pocillo 4	Pocillo 5
LEVOTIROXINA 1 g/ml	-	1 mg 100 µl	2 mg 200 µl	3 mg 300 µl	4 mg 400 µl	5 mg 500 µl
AMOXICILINA 1 g/10 ml	-	1 mg 10 µl	2 mg 20 µl	3 mg 30 µl	4 mg 40 µl	5 mg 50 µl
AC. HIALURÓNICO + COLÁGENO 250 mg/ml	-	25 mg 100 µl	50 mg 200 µl	75 mg 300 µl	100 mg 400 µl	125 mg 500 µl
ÁCIDO FÓLICO 10 g/ml	-	4 mg 100 µl	8 mg 200 µl	12 mg 300 µl	16 mg 400 µl	20 mg 500 µl

RESULTADOS

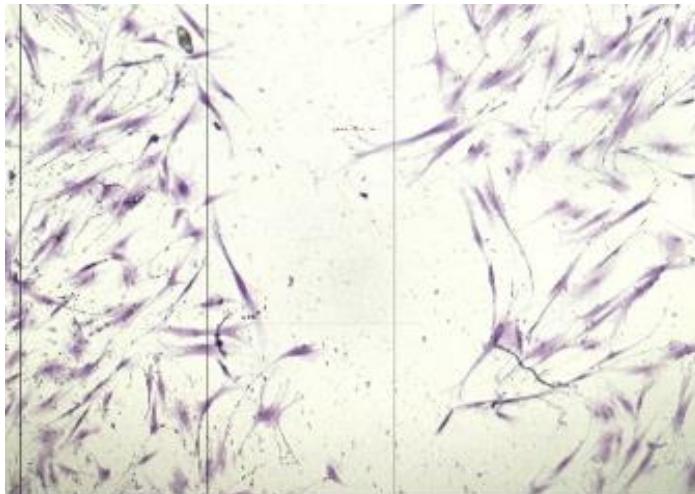


1.- Análisis de la tasa de cierre de la brecha:

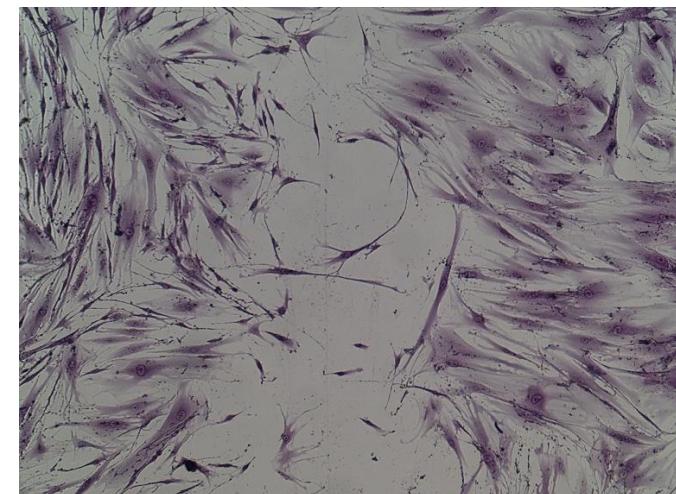
- por el estrechamiento de la franja
- se mide la ↓ anchura de la herida con un programa informático

2.- Cuantificamos la migración de los fibroblastos: Nº de células en

* migración individual

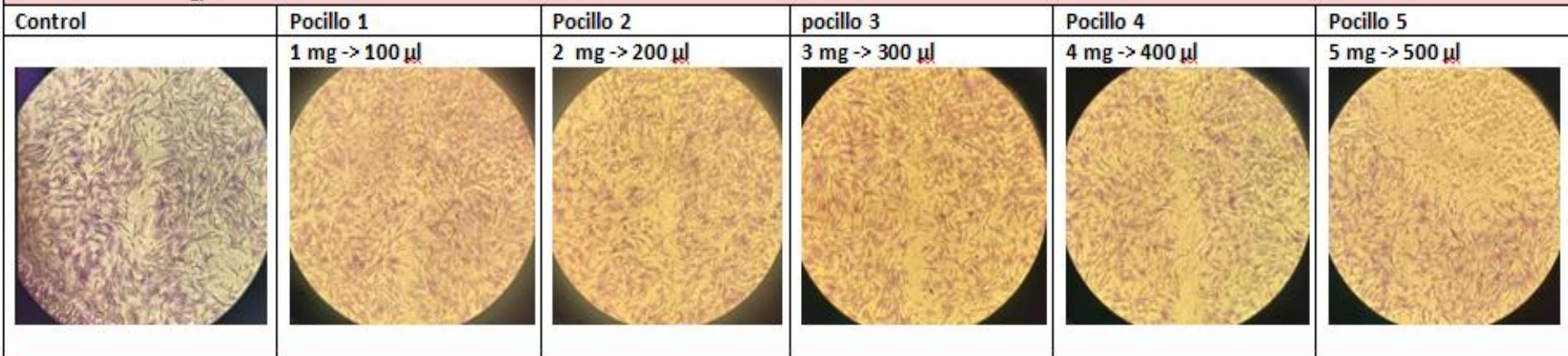


* migración grupal

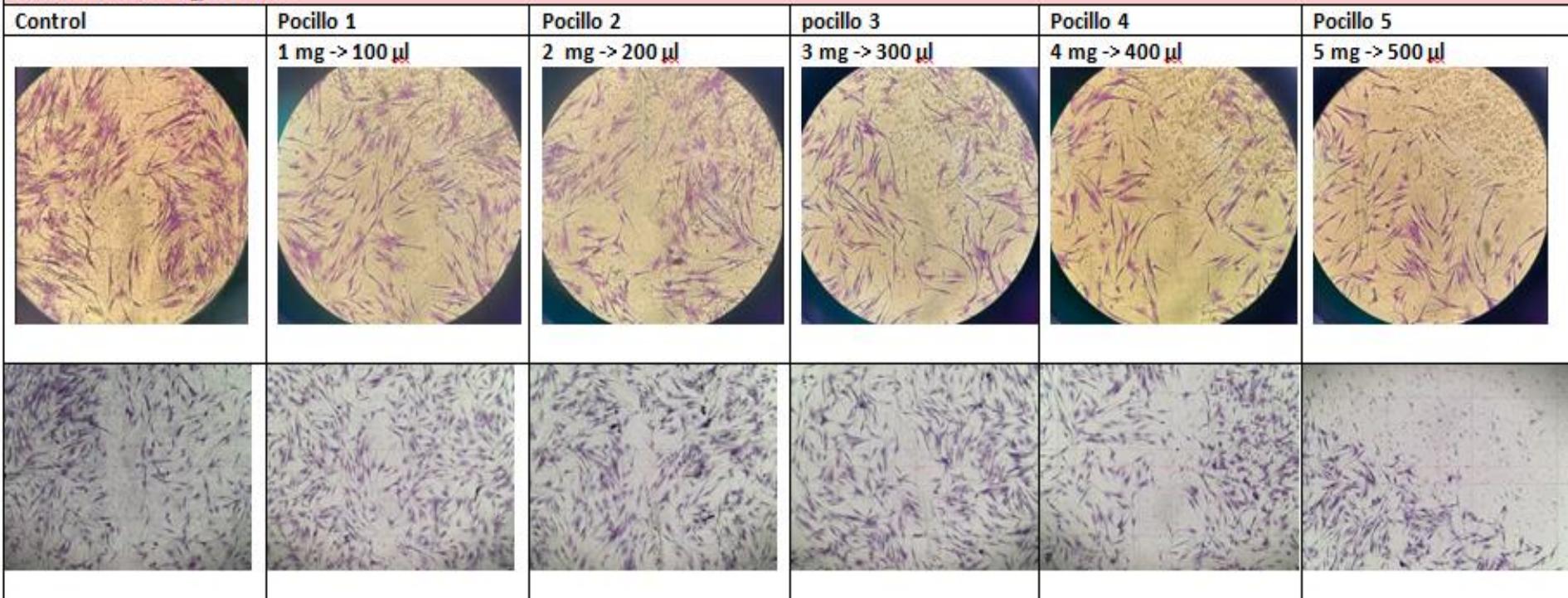


RESULTADOS

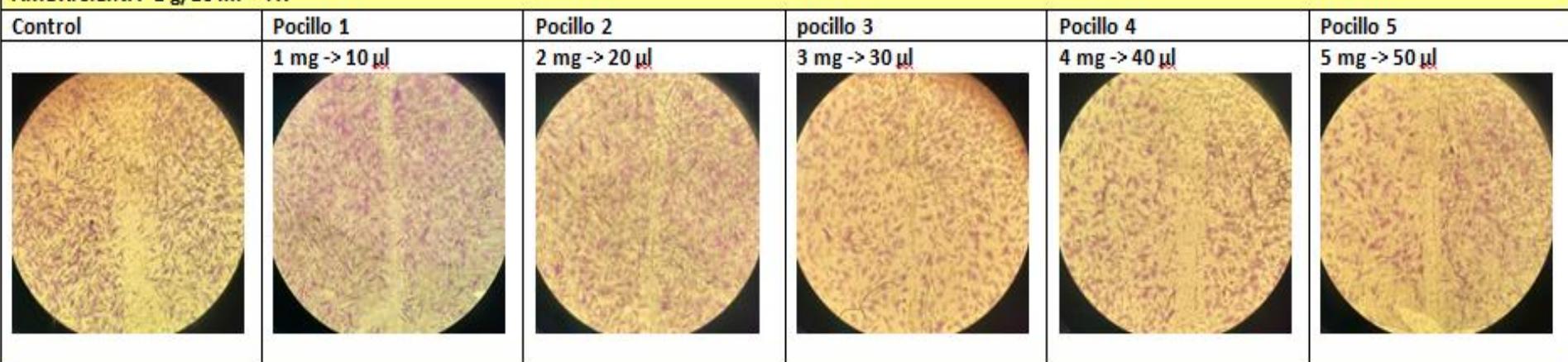
LEVOTIROXINA 1 g/ml 4X



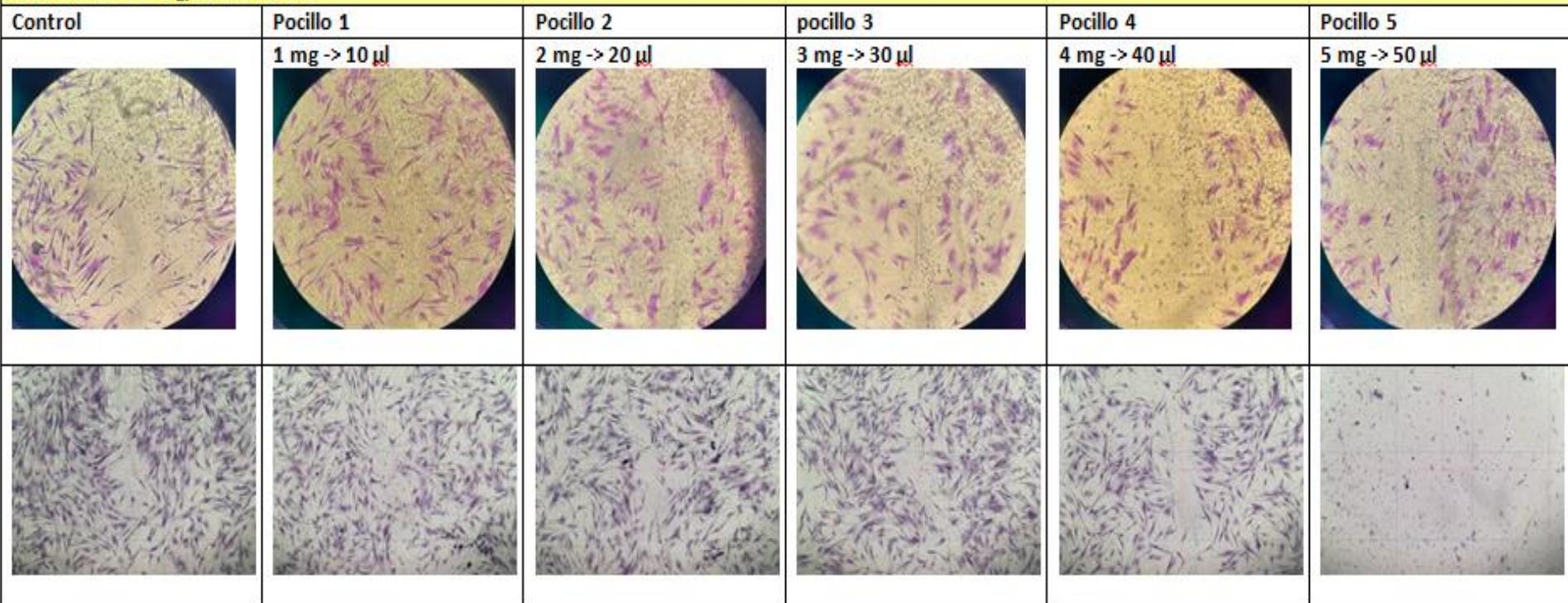
LEVOTIROXINA 1 g/ml 10X



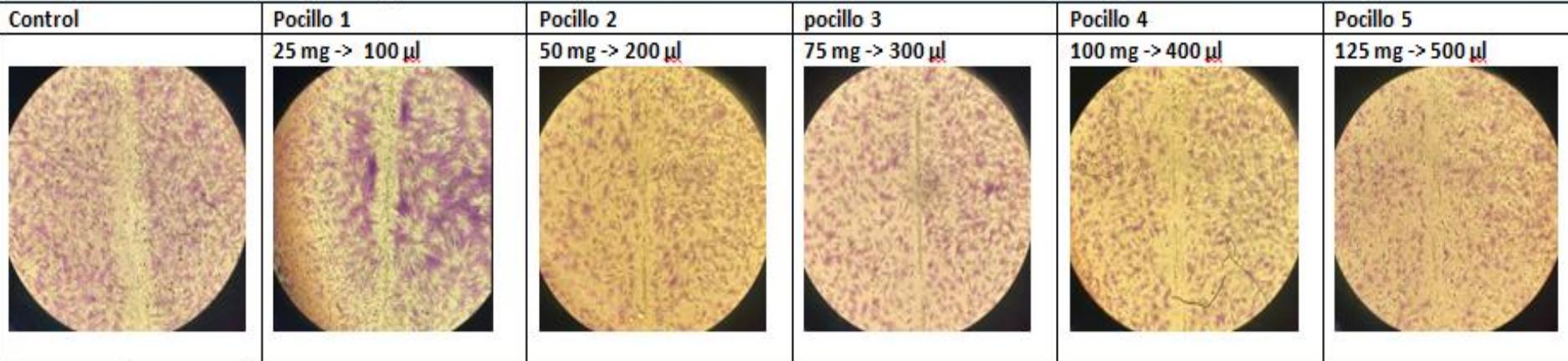
AMOXICILINA 1 g/10 ml 4X



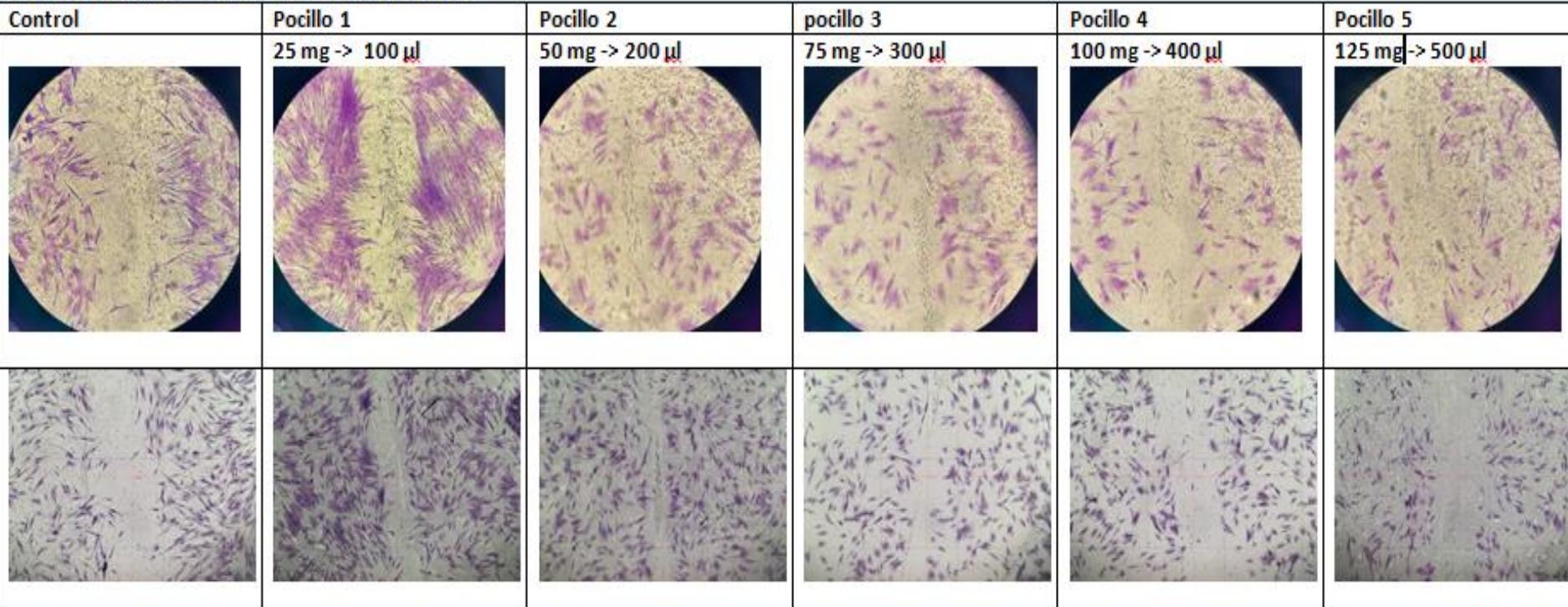
AMOXICILINA 1 g/10 ml 10X



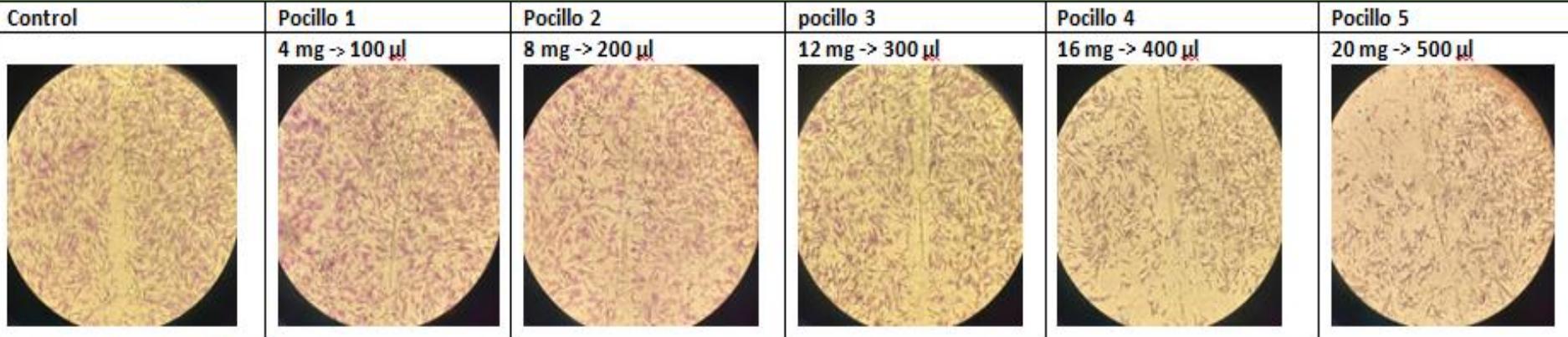
AC. HIALURÓNICO + COLÁGENO 250 mg/ml 4 X



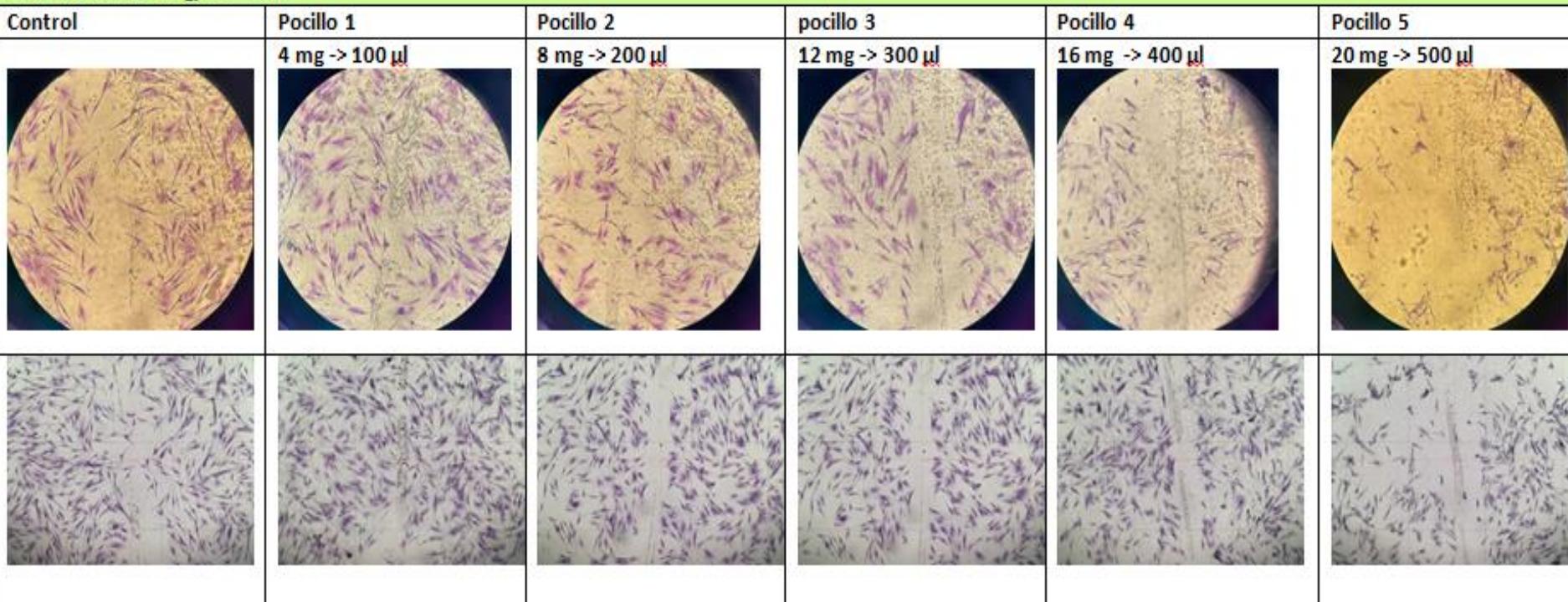
AC. HIALURÓNICO + COLÁGENO 250 mg/ml 10 X



ÁCIDO FÓLICO 40 g/ml 4 X



ÁCIDO FÓLICO 40 g/ml 10X

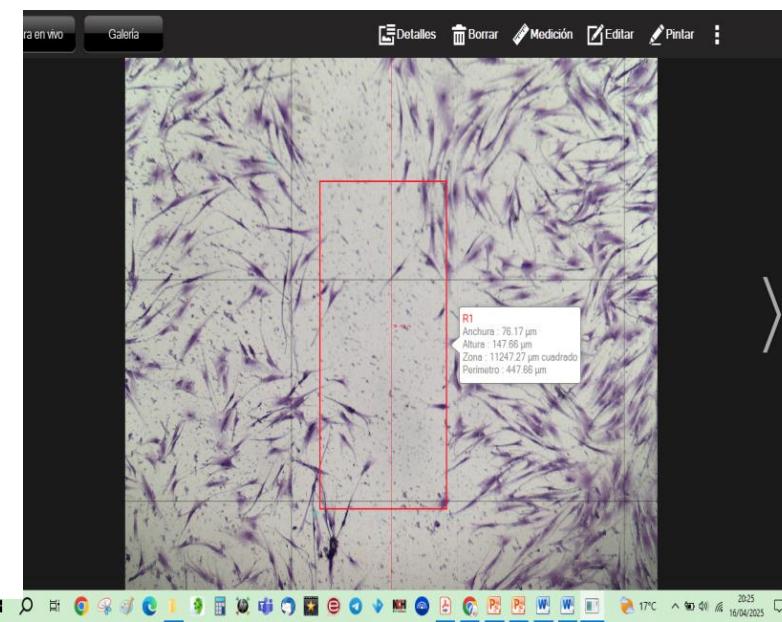


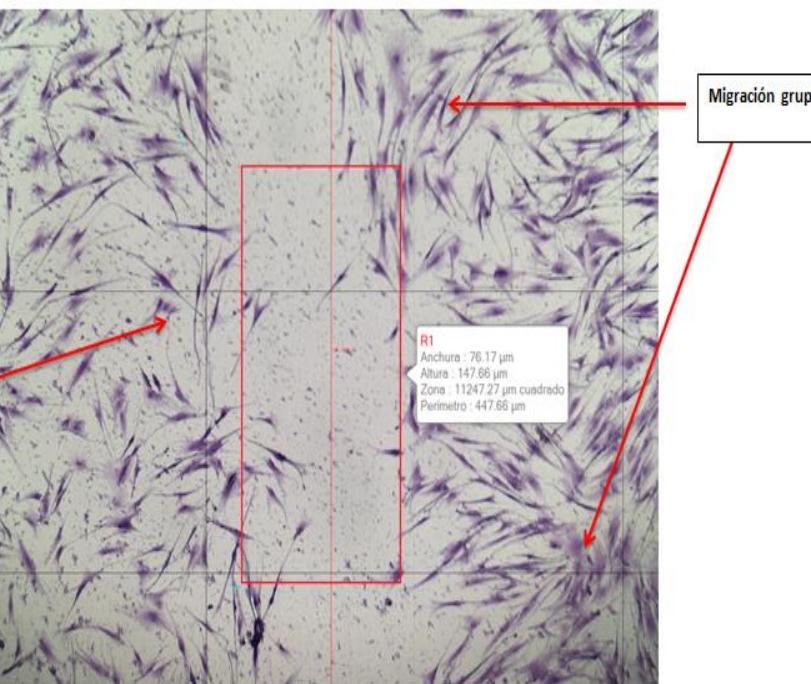
RESULTADOS

Los distintos compuestos se evaluaron en un modelo in vitro de herida en monocapa celular observando el efecto de cada compuesto a distintas concentraciones sobre la **migración individual y en grupo** de los **fibroblastos** para acercar los bordes de la herida.



Se han tomado imágenes del cultivo celular 24 horas después de la incubación con los compuestos utilizando el **Software MotiConnect** para evaluar la aproximación de la herida y el número de células individuales y en grupo que han migrado.

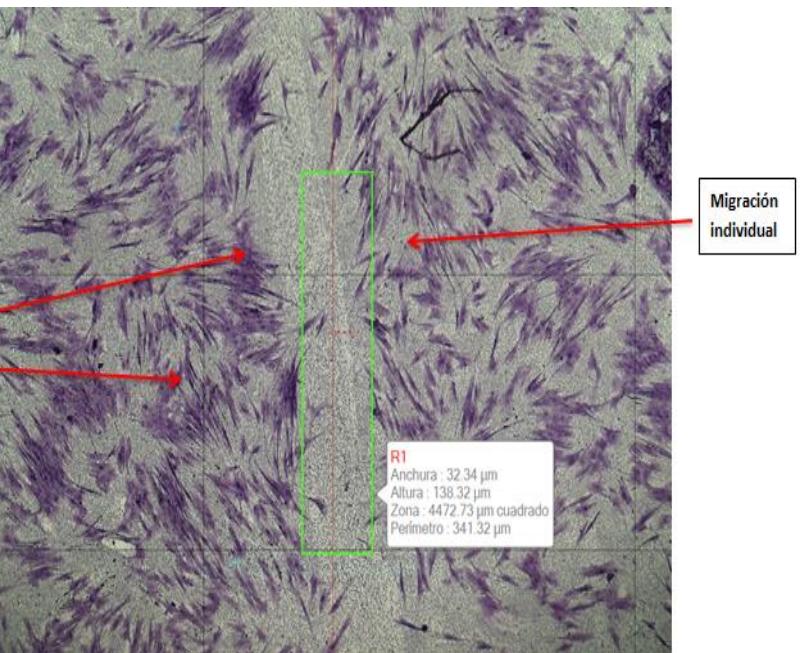




MEDIDA DE LA ANCHURA DE LA HERIDA EN LA SERIE CON AC. HIALURÓNICO Y COLÁGENO

Control:

La anchura de la herida es **147,66 μm.**
Se observa migración celular individual y en grupo.



Pocillo 1: Ac. hialurónico + colágeno:

La anchura de la herida es **128,32 μm.**
Se observa migración celular individual y en grupo incrementadas respecto al control sin ningún aditivo.

CONCLUSIONES

* LEVOTIROXINA

El incremento de concentración de levotiroxina no inhibe la migración celular e incluso parece favorecerla.

Se observa la disminución de la distancia entre los bordes de la herida en todos los pocillos a distintas concentraciones del compuesto.

También se observa cierta activación de la migración individual y en grupo de los fibroblastos incubados 24 horas con diferentes concentraciones de Levotiroxina.

* AMOXICILINA

A las concentraciones utilizadas en el ensayo el antibiótico no parece inhibir significativamente el crecimiento de los fibroblastos ni la migración si bien el acercamiento de los bordes de la herida es menor que con los otros compuestos. Puede ser debido a una migración más lenta pero habría que comprobarlo con otros ensayos.

* AC. HIALURÓNICO + COLÁGENO

La combinación de estos dos compuestos parece favorecer la migración ya que se observa una aproximación de los bordes de la herida salvo en el ultimo pocillo con mayor concentración.

También parece estimular la migración grupal lo que se observa más marcado en los pocillos 2 y 3 con concentraciones de 25 y 50 mg respectivamente.

* ÁCIDO FÓLICO

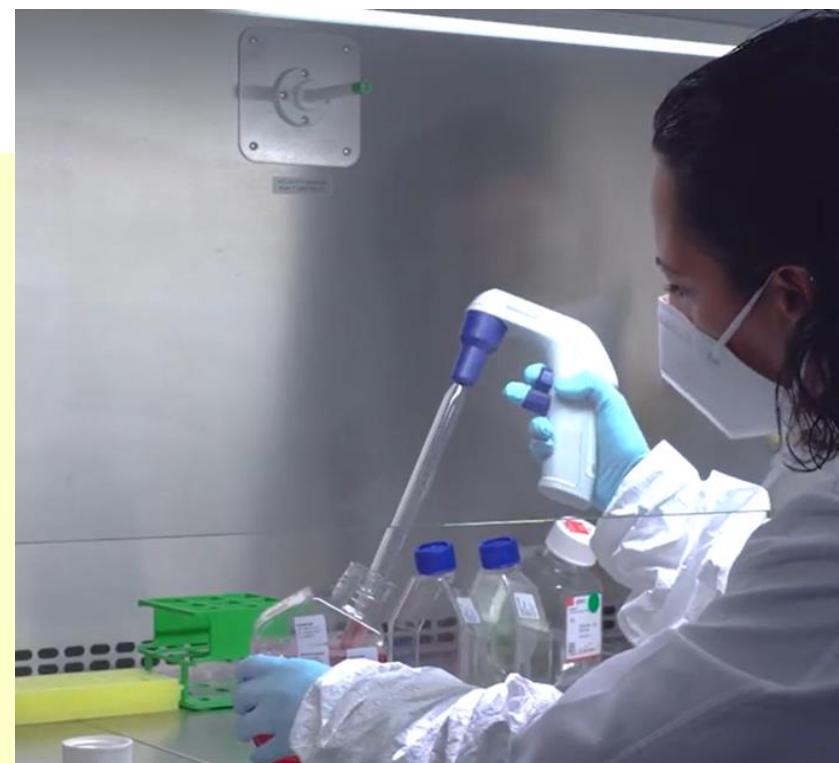
La suplementación con ácido fólico o vitamina B9, produce una disminución de la anchura de la herida que se observa de modo más evidente en los pocillos 2, 3 y 4 con concentraciones de 4 mg, 8 mg y 12 mg respectivamente.

Salvo en el último pocillo de mayor concentración, parece que la migración individual y en grupo está favorecida con la adición de este compuesto.

AGRADECIMIENTOS



Biobanco del Sistema Sanitario Público
de Andalucía
Consejería de Salud y Consumo



- ❖ **Dña. M^a Gertrudis Ligero Martín.**
Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía.
NODO COORDINADOR.
Parque Tecnológico Ciencias de la Salud.
Centro de Investigación Biomédica.
Avda. del Conocimiento s/n, 18016 Granada, España.
Tel.: 958 894 672 - Fax: 958 894 652. biobanco.sspa@juntadeandalucia.es
- ❖ **I.E.S Fuensanta.**
- ❖ **En especial a A. Gema Sicilia Zafra**, coordinadora del proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

1. <https://magazine.x115.it/wp-content/webp-express/webp-mages/uploads/2021/02/fibroblasto-1536x1158.jpg.webp>
2. Hernández-Pasteur Griselda, Silva-Bermúdez Phaedra S., Reyes-Chilpa Ricardo, Vibrans Heike, Soto-Hernández Marcos. Evaluación in vitro de la actividad cicatrizante y antibacteriana de extractos de extractos de Buddleja cordata KUNTH Y Vismia baccifera (L.) TRIANA & PLANCH. Rev. fitotec. mex [revista en la Internet]. 2019 Jun [citado 2025 Abr 16]; 42(2): 93-99. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802019000200093&Ing=es. Epub 16-Ago-2019.
3. Calvo-Castro, Laura A., Guerrero-Barrantes, Maritza, Centeno-Cerdas, Carolina, Chaves-Rodríguez, María Inés, Chaves-Solano, Nefertiti, & Rojas-Chaves, Miguel. (2015). Cultivo in vitro de autoinjertos epiteliales para el tratamiento de lesiones en la piel. Revista Tecnología en Marcha, 28(Suppl. 1), 33-45. <https://dx.doi.org/10.18845/tm.v28i5.2218>
4. Adib, K. Serror, L. Michel, Fisiología de la cicatrización de las heridas cutáneas: análisis centrado en el papel de la respuesta inmunitaria innata y las aplicaciones terapéuticas, EMC - Dermatología, Volume 58, Issue 2, 2024, Pages 1-13, ISSN 1761-2896, [https://doi.org/10.1016/S1761-2896\(24\)49117-6](https://doi.org/10.1016/S1761-2896(24)49117-6).
5. Checa Rojas, A. (2018, 25 de Septiembre). Conogasi, Conocimiento para la vida. Fecha de consulta: Mayo 11, 2024.
6. Adult bone marrow progenitors become decidual cells and contribute to embryo implantation and pregnancy, Reshef Tal ,Shafiq Shaikh,Pallavi Pallavi,Aya Tal,Francesc López-Giráldez,Fang Lyu,Yuan-Yuan Fang,Shruti Chinchanikar,Ying Liu,Harvey J. Kliman,Myles Alderman III,Nicola Pluchino,Jehanzeb Kayani, [...],Hugh S. Taylor[view all], Published: September 12, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000421>.
7. Larouche J, Sheoran S, Maruyama K, Martino MM. Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. Adv Wound Care (New Rochelle). 2018 Jul 1;7(7):209-231. doi: 10.1089/wound.2017.0761. PMID: 29984112; PMCID: PMC6032665.
8. Liang, CC., Park, A. y Guan, JL. Ensayo de rayado in vitro : un método práctico y económico para el análisis de la migración celular in vitro . Nat Protoc 2 , 329–333 (2007). <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
9. Breetveld M, Richters CD, Rustemeyer T, Scheper RJ, Gibbs S. Comparison of Wound Closure after Burn and Cold Injury in Human Skin Equivalents J. Invest. Dermatol. 2006; 126: 1918 – 1921.
10. Wang, JF; Jiao, H; Stewart, TL; Shankowsky, HA; Scott, PG; Tredget, EE. Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts. Wound Rep. Reg. 2007; 15: 113 – 121.

**GRACIAS POR SU
ATENCIÓN**

**CURSO DE
ESPECIALIZACIÓN EN
CULTIVOS CELULARES**



TÍTULO DE MASTER DE FP



Edificios del I.E.S. "La Fuensanta"

**IV CONGRESO CIENTÍFICO
INTERNACIONAL
"EUROCIENCIA JOVEN"**

**IES "LA FUENSANTA"
CÓRDOBA**

