

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

IN VITRO STUDY OF THE EFFECT OF VARIOUS COMPOUNDS ON FIBROBLAST MIGRATION



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

¹ Alumnas del Máster de Especialización en Cultivos Celulares.

² Profesora Coordinadora del IES La Fuensanta.

Instituto de Educación Secundaria “La Fuensanta”. Departamento de Sanidad
C/. Calderón de la Barca s/n, 14.010-Córdoba
Teléfono 957-75 08 88, Fax 957-75 17 53
gema.sicilia@ieslafuensanta.es

IES “LA FUENSANTA”
CÓRDOBA



CURSO DE
ESPECIALIZACIÓN EN
CULTIVOS CELULARES

INTRODUCCION

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y cumple diversas funciones como barrera de protección. La dermis es la capa más profunda de la piel y le proporciona estructura, fuerza, nutrición y flexibilidad. Está compuesta principalmente por fibroblastos dérmicos. Cuando la estructura de la piel se daña, los fibroblastos se multiplican y migran a la herida, ayudando a producir *matriz extracelular, regular la inflamación en curso y reparar el tejido*.

La matriz extracelular está constituida por un entramado de moléculas, sobre todo proteínas y carbohidratos secretadas por las propias células, que rellenan el espacio intercelular.

Las propiedades que tienen algunos tejidos como resistencia, dureza, elasticidad, hidratación o propiedades ópticas, dependen de su matriz extracelular. La matriz extracelular aporta a las células señales moleculares para la *diferenciación, supervivencia, migración y proliferación*, y para mantener la *homeostasis* del tejido donde se encuentran.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 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, y con penicilina, estreptomina, fluconazol y gentamicina, para evitar la contaminación del medio.
- Cuando el cultivo esta en un 80-85 % de confluencia se levantan las células con tripsina al 0,25 % y se hace un recuento y % de viabilidad con azul tripán en cámara de Neubauer modificada.
- A partir del recuento se siembran dos placas p24 con medio de cultivo específico y con % de FBS reducido , 5 ml de L-glutamina, y con penicilina, estreptomina, fluconazol y gentamicina, para evitar la contaminación del medio. Se siembran 2 x 10⁴ células/pocillo.
- Tras una semana de incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 90 % de humedad, realizando cambio de medio a las 24 horas y posteriormente cada 3-4 días, se llega a una confluencia del 80 % aproximadamente.
- Se realiza una ‘herida’ en cada pocillo 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. Se incuba 24 horas a 37°C, 5 % de CO₂ y 90 % de humedad.
- Se retira el medio de cultivo, se fijan las células con metanol y se tiñen con cristal violeta al 0,5 %.
- Se analizan las imágenes obtenidas al microscopio invertido con cámara digital midiendo la distancia entre los bordes de la herida y comparando los resultados obtenidos en los pocillos.

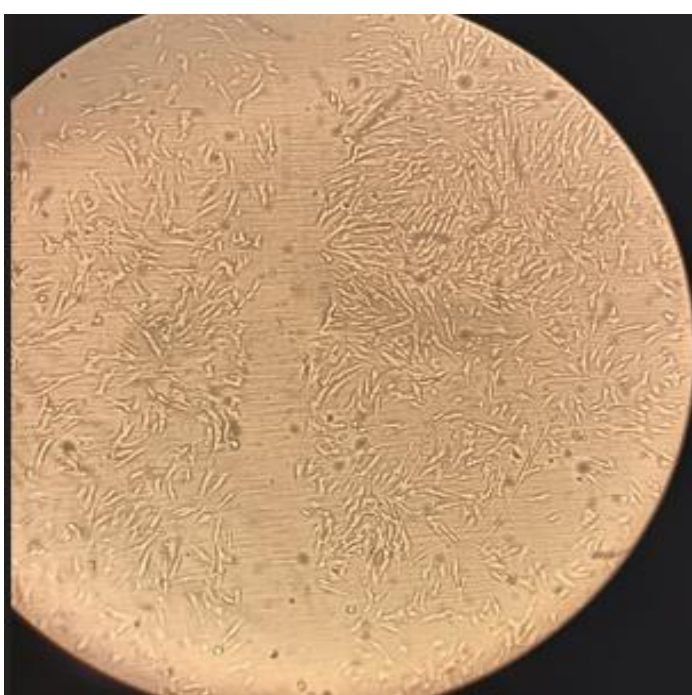
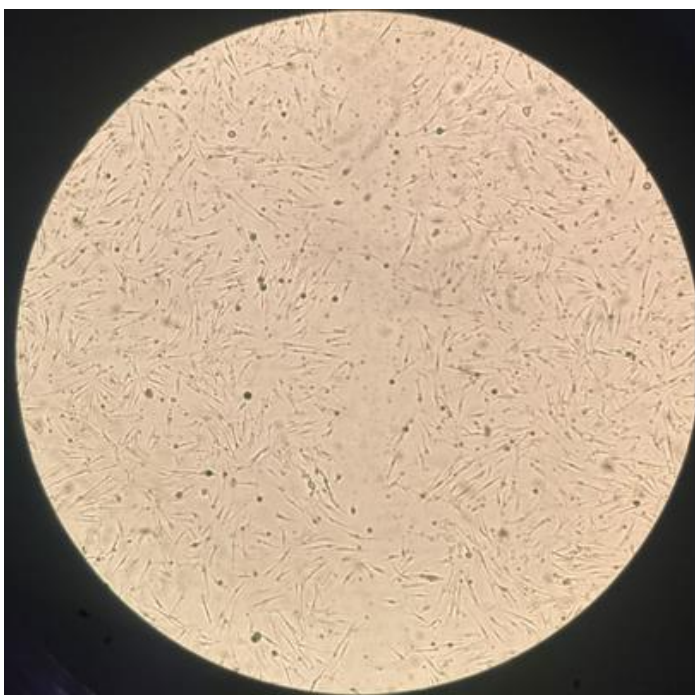
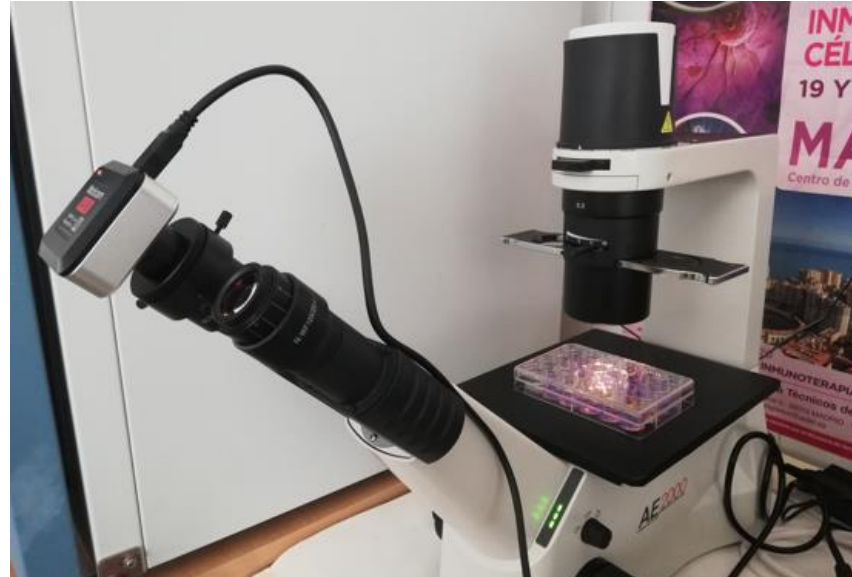
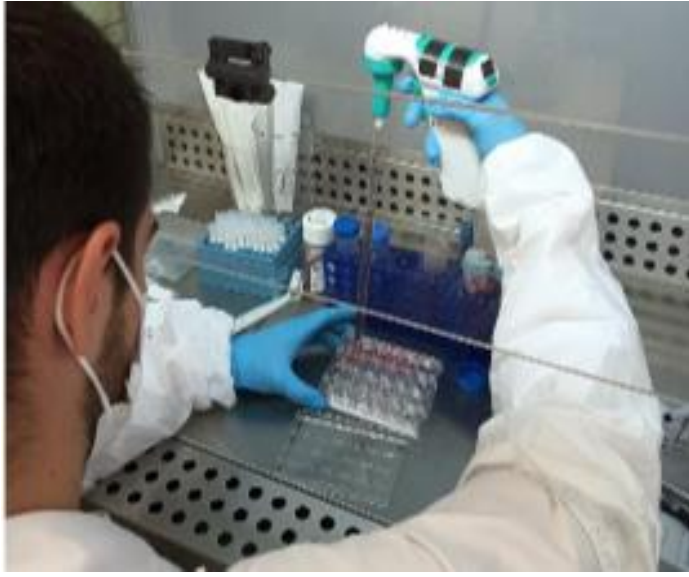
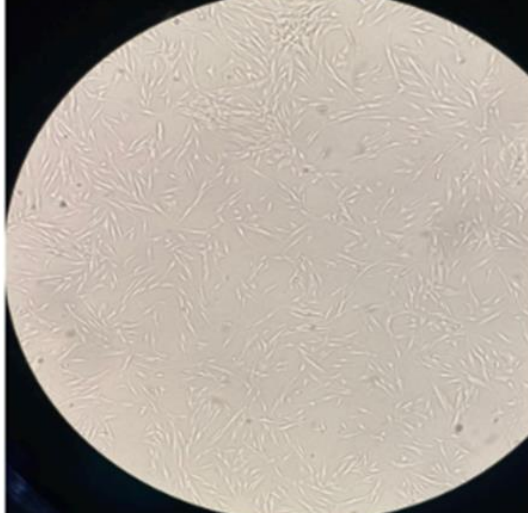
OBJETIVOS

El propósito de este trabajo de investigación es ver la influencia de diferentes sustancias en la migración de los fibroblastos que son los reparadores naturales de los daños ocasionados en la piel.

Se utilizó una línea de Fibroblastos Adultos Humanos (HAF) derivados de piel para el ensayo. Se investiga la activación o inhibición de los mecanismos naturales de reparación de una herida in vitro tras la incubación del cultivo celular con distintos compuestos a diferentes concentraciones.

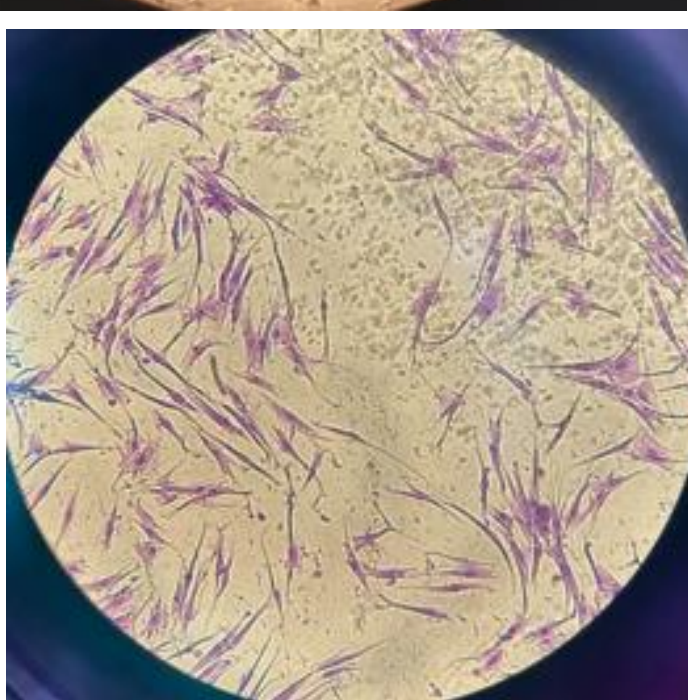
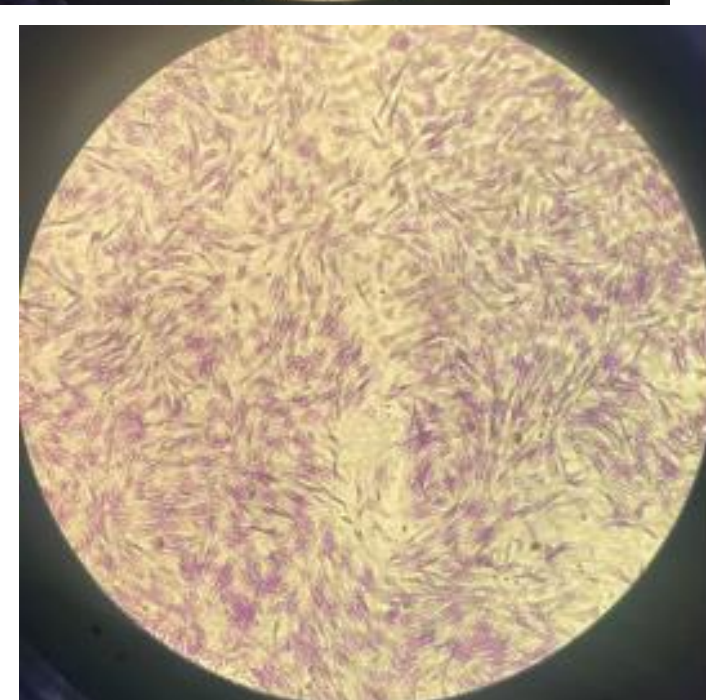
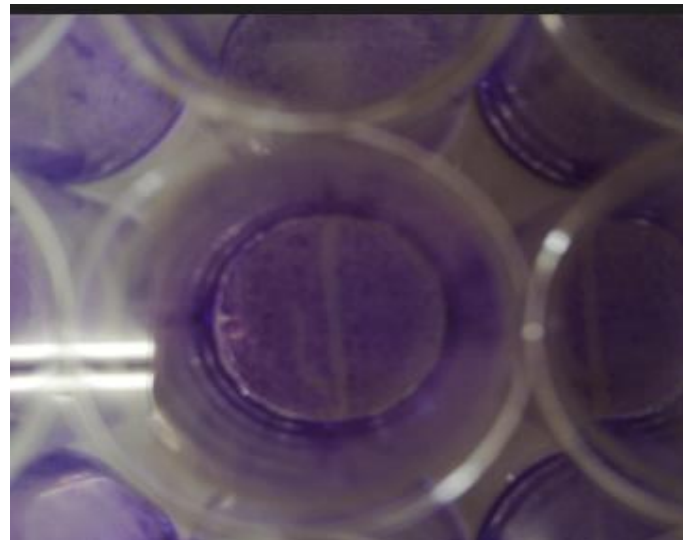
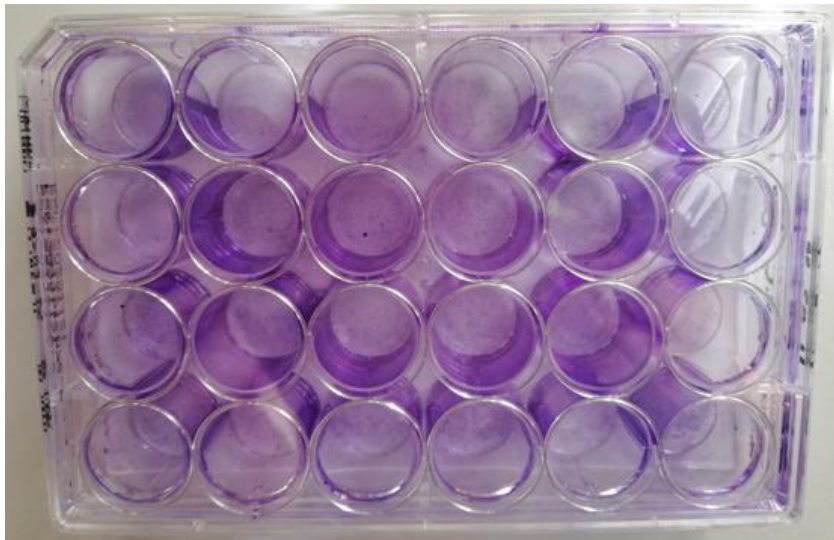
Algunos compuestos son componentes de la matriz extracelular y otros se podrían considerar como posibles factores de crecimiento o suplementos del medio de cultivo.

También se han investigado algunos antibióticos utilizados habitualmente en algunos tipos de infecciones.



RESUTADOS

AC. HIALURÓNICO + COLÁGENO 250 mg/ml 4 X					
Control +	Pocillo 1 25 mg/ml -> 100 µl	Pocillo 2 50 mg/ml -> 200 µl	pocillo 3 75 mg/ml -> 300 µl	Pocillo 4 100 mg/ml -> 400 µl	Pocillo 5 125 mg/ml -> 500 µl
AC. HIALURÓNICO + COLÁGENO 250 mg/ml 10 X					
Control +	Pocillo 1 25 mg/ml -> 100 µl	Pocillo 2 50 mg/ml -> 200 µl	pocillo 3 75 mg/ml -> 300 µl	Pocillo 4 100 mg/ml -> 400 µl	Pocillo 5 125 mg/ml -> 500 µl



CONCLUSIONES

LEVOTIROXINA

El incremento de concentración 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

Esta combinación favorecer la migración ya que se observa una aproximación de los bordes de la herida salvo en el último 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.

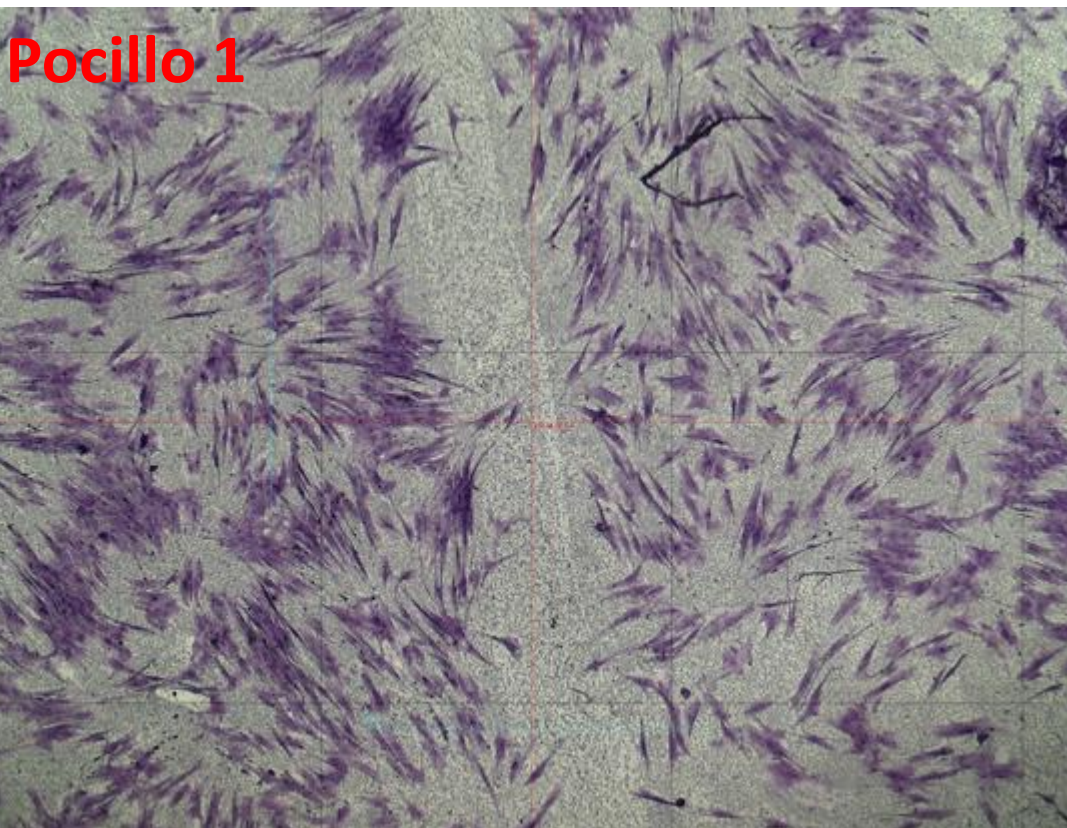
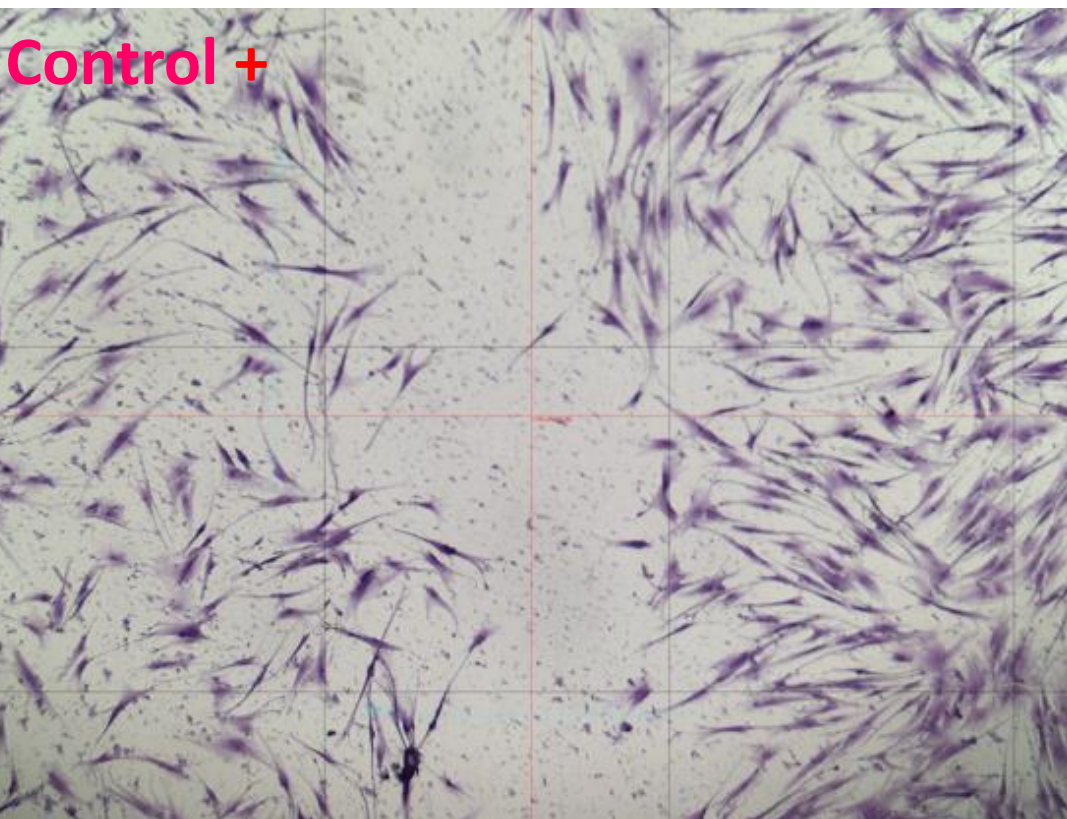
ÁCIDO FÓLICO

La suplementación 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. Salvo en el último pocillo de mayor concentración, parece que la migración individual y en grupo esta favorecida con la adición de este compuesto al cultivo.

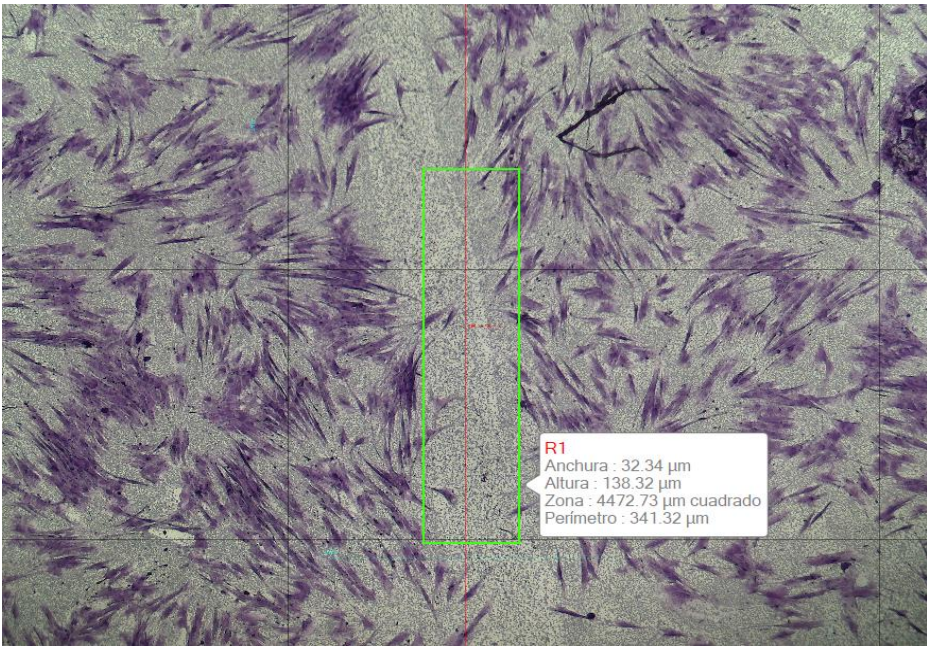
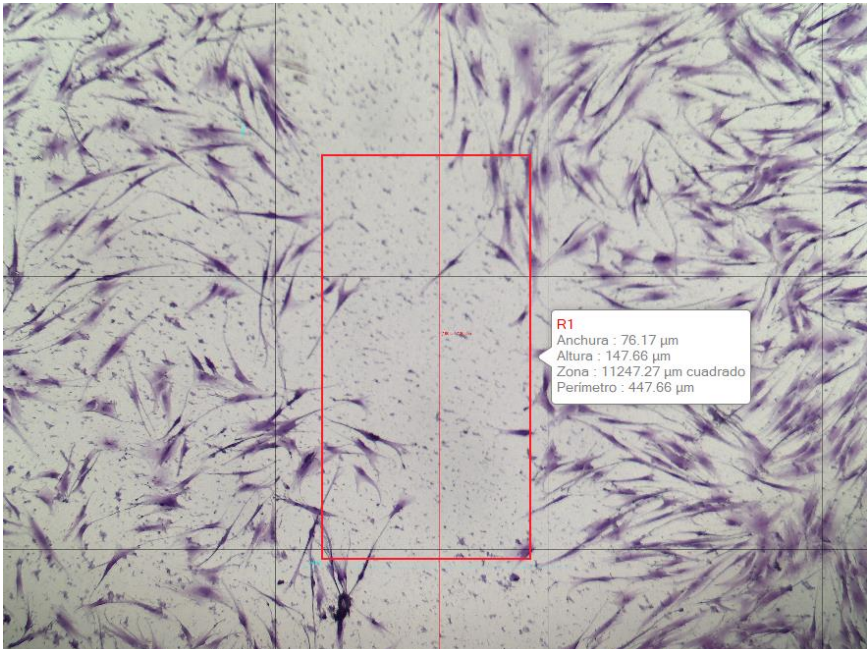
AGRADECIMIENTOS:

D^a M^a Gertrudis Ligeró 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.ssipa@juntadeandalucia.es



	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/ml 100 µl	50 mg/ml 200 µl	75 mg/ml 300 µl	100 mg/ml 400 µl	125 mg/ml 500 µl
ÁCIDO FÓLICO 40 g/ml	-	4 mg 100 µl	8 mg 200 µl	12 mg 300 µl	16 mg 400 µl	20 mg 500 µl



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

Pocillo 1 con ácido hialurónico mas colágeno: La anchura de la herida es de 128,32 µm.
Se observa migración celular individual y en grupo incrementadas respecto al control sin ningún aditivo