

ENSAYO DE CICATRIZACIÓN IN VITRO, PARA EVALUAR MIGRACIÓN CELULAR Version 2

Jesica Palacio, Lily Johanna Toro, Germán Alberto Téllez Ramírez, JUAN PABLO BEDOYA AGUDELO, Diana Carolina Henao, Jhon Carlos Castaño Osorio

Abstract

El ensayo de herida o ruptura *in vitro*, es un método fácil, de bajo costo y bien desarrollado para medir migración celular *in vitro*. Los pasos básicos implican la creación de una “herida” en una monocapa celular, capturando las imágenes al principio y en intervalos regulares de tiempo durante la migración celular para cerrar la herida y comparar las imágenes para cuantificar la tasa migración de las células.

La realización de este protocolo fue posible gracias al apoyo del departamento administrativo de ciencia tecnología e innovación, Colciencias a través del proyecto 111356933173 convocatoria569-2012.

Citation: Jesica Palacio, Lily Johanna Toro, Germán Alberto Téllez Ramírez, JUAN PABLO BEDOYA AGUDELO, Diana Carolina Henao, Jhon Carlos Castaño Osorio ENSAYO DE CICATRIZACIÓN IN VITRO, PARA EVALUAR MIGRACIÓN CELULAR.
protocols.io

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kdics4e

Published: 19 Oct 2017

Guidelines

Los pasos básicos implican la creación de una ruptura o 'herida' en una monocapa celular, capturando las imágenes al principio y en intervalos regulares durante la migración celular hasta el cierre de la herida y comparando las imágenes para cuantificar el porcentaje de cierre.

Before start

Trabajar con las células dos o tres días después de descongeladas.

Realizar la señal en el reverso de la placa como guía de referencia para el registro fotográfico.

Pretratar la placa de cultivo con colágeno un día antes de la realización del ensayo.

Preparar las soluciones a utilizar:

- Fibronectina

- Control negativo
- Control positivo
- Tratamientos a evaluar

Materials

- ✓ Incubator - Light, humidity and temperature controlled by Contributed by users
- ✓ P1000 micropipet and Filter Tips by Contributed by users
- ✓ P200 micropipets and 200 µl filter tips by Contributed by users
- ✓ P20 micropipet and filter tips by Contributed by users
- ✓ Centrifuge with 50 ml and 15 ml tube adaptors by Contributed by users
- ✓ conical tubes, 15ml by Contributed by users
- ✓ conical tubes, 50ml by Contributed by users
- 10 g Hydrocortisone [orb322533](#) by [biorbyt](#)
- cell culture plate 24 well [View](#) by [Sigma-aldrich](#)
- Counting Chambers by [Sigma-aldrich](#)
- human keratinocytes PCS200011 by [ATCC](#)
- Collagen C8919 by [Sigma](#)
- Bovine Plasma Fibronectin 33010-018 by [Life Technologies](#)
- Epidermal growth factor AF-100-15 by [peprotech](#)
- Trypsin EDTA 25-051-Cl. by [Gibco - Thermo Fischer](#)

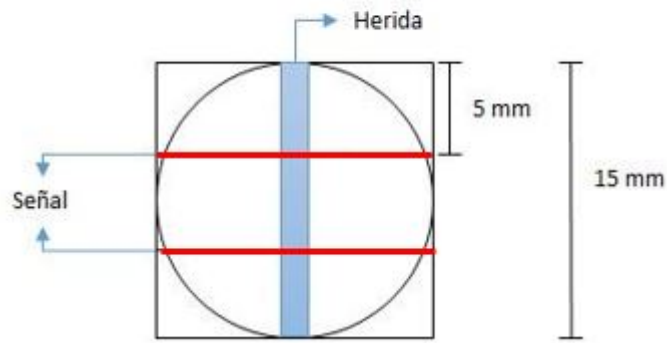
Protocol

Preparación de la placa

Step 1.

Con un bisturí o escalpelo, realizar dos muescas horizontales con 5 mm de distancia a manera de señal en el reverso del pozo de una caja de 24 pozos (ver esquema).

Pozo (caja de 24 pozos)



Recubrimiento con colágeno

Step 2.

Adicionar 400 μ L/pozo de colágeno a 0,1 mg/mL dejar incubar durante 4 horas a 37°C

Remover el exceso de colágeno y dejar secar la placa en vacío por 20 minutos; o dejar secar toda la noche a temperatura ambiente o 37°C



REAGENTS

Collagen from calf skin [C8919](#) by [Sigma Aldrich](#)

Adhesión celular (queratinocitos humanos HaCat)

Step 3.

Sembrar las células a una concentración de 250.000 células/pozo (confluencia del 85 a 90%) en placas de 24 pozos en DMEM 1X suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 2%, antibiótico-antimicótico al 1X y piruvato de sodio a 1mM.

Incubar la placa a 37°C y 5% de CO₂ durante 6 a 8 horas.

NOTES

Grupo de Inmunología Molecular Universidad del Quindío 11 Aug 2017

Trabajar con las células dos o tres pases después de descongeladas.

Se adicionan el numero de celulas por pozo necesarias para que alcancen una confluencia de 85-90%.

Realizar la disgregación celular utilizando tripsina-EDTA (Gibco 25200056) hasta que la células

queden deprendidas de manera individual con una viabilidad mayor del 90%.

Herida in-vitro

Step 4.

Después de observar la monocapa celular en cada uno de los pozos y sin retirar el medio, realizar la herida o ruptura *in vitro* pasando con una punta estéril de 200 µL sobre la mitad del pozo en dirección vertical y perpendicular a las señas realizadas en el reverso del pozo. Utilizar 1 punta nueva por cada pozo.

Retirar el medio y lavar tres veces con PBS 1X (NaCl 0.14M; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 10.1mM; KH₂PO₄ 1.8mM pH 7.4).

Adicionar 300 µL de fibronectina a una concentración final de 5µg/mL e incubar por 1 hora a 37°C y 5% de CO₂.

Lavar tres veces con PBS 1X.

Añadir los controles como sigue (1mL/pozo):

1. **Blanco (B)** : medio de cultivo (DMEM 1X al 2% de SFB)
2. **Control positivo (CP)**: para células HaCat: Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) (stock 50 µg/mL) concentración final en el pozo de 40 ng/mL.
3. **Control negativo (CN)**: hidrocortisona concentración final de 10µg/mL.
4. **Tratamientos (T#)**: evaluar en medio de cultivo (DMEM 1X al 2% de SFB) para un volumen final de 1 mL/pozo.

Proceda a incubar por las horas correspondientes a 37°C y 5% de CO₂ y tome las fotos correspondientes.

Tabla. Diseño de la placa de 24 pozos.

	1	2	3	4	5	6
A	B	CP	CN	T1	T2	T3
B	B	CP	CN	T1	T2	T3
C	B	CP	CN	T1	T2	T3
D						



REAGENTS

Fibronectin Human Protein, Native [PHE0023](#) by [Gibco - Thermo Fischer](#)

Epidermal growth factor AF-100-15 by [peprotech](#)

hydrocortison [INVIMA 2004M-0003102](#) by [Vitalis](#)

NOTES

Grupo de Inmunología Molecular Universidad del Quindío 14 Aug 2017

Se recomienda practicar en un cultivo preliminar antes de realizar el ensayo con el fin de afinar la dirección, presión y pulso para realizar la herida.

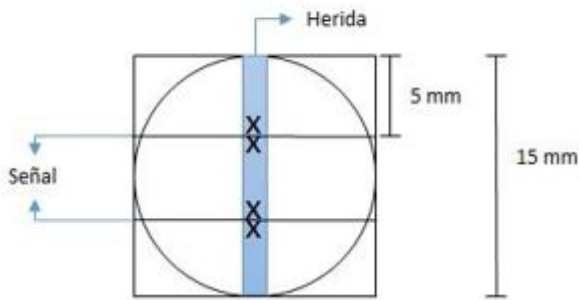
Registro fotográfico

Step 5.

Tomar fotografías a los tiempos (0, 12, 24, 36 y 48 horas) en microscopio invertido a 40x de objetivo obteniendo 4 fotos por pozo. Inicie fotografiando el blanco, control positivo, control negativo y continúe con los tratamientos (1, 2, 3, 4) (Ver diseño de la placa). Marque cada foto con el número correspondiente en una hoja de calculo y almacénelas en carpetas separadas por cada tiempo correspondiente.

Para asegurar que la foto se tome en el mismo punto, ubicar la señal encima o debajo del campo visual del microscopio, situando en el centro del campo, la herida. Procurar que la señal no quede en campo visual del microscopio para no tener errores en la medida del área.

Pozo (caja de 24 pozos)



Tomar las fotos en los puntos marcados con la "X" en la figura anterior.

Tome las fotos en el siguiente orden: Control positivo, Control negativo, Muestra 1, Muestra 2, Muestra 3, Muestra 4, Vehículo y medio.

Utilizar las mismas condiciones de iluminación, contraste, posición del difusor para cada foto, en todos los tiempos correspondientes.

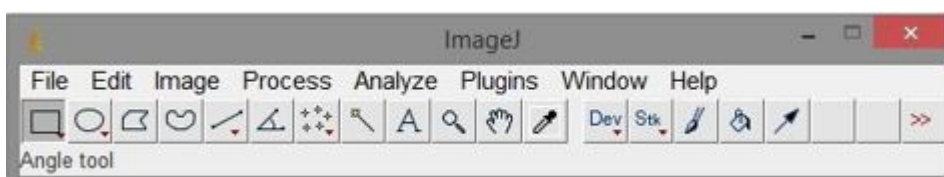
Para el análisis de los datos, calcule el área de la herida para cada pozo en cada tiempo correspondiente con el Software ImageJ y posteriormente realice el cálculo del cierre de la herida para cada tiempo.

Cálculo de áreas mediante el software ImageJ

Step 6.

1. Descargar e instalar el Software ImageJ (Versión 1.50i) del siguiente Link:
<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>.

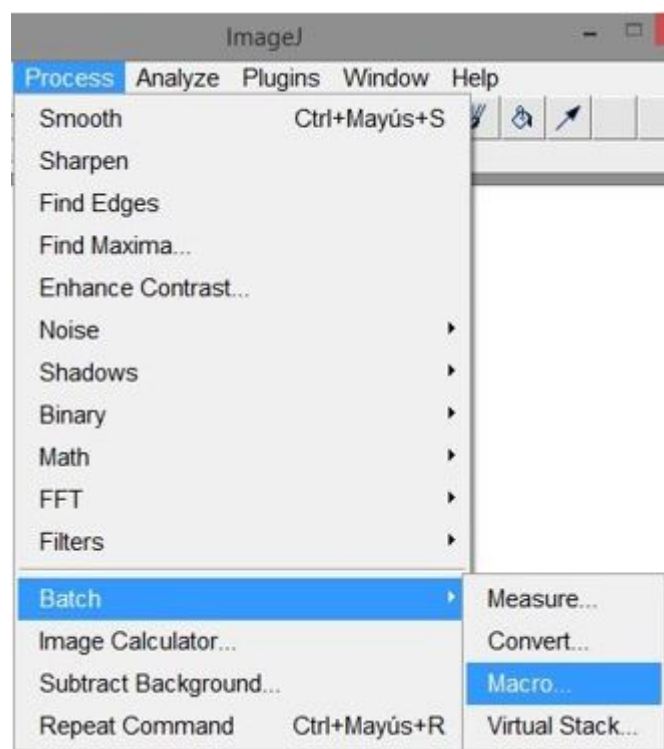
2. Abrir el ImageJ y deberá aparecer una ventana como la mostrada en la siguiente figura:



Para crear el macro:

1. Abra un archivo de texto (bloc de notas)
2. Pegue las instrucciones del macro (ver en la parte inferior)
3. Guarde el archivo con la extension *.ijm en la carpeta deseada.

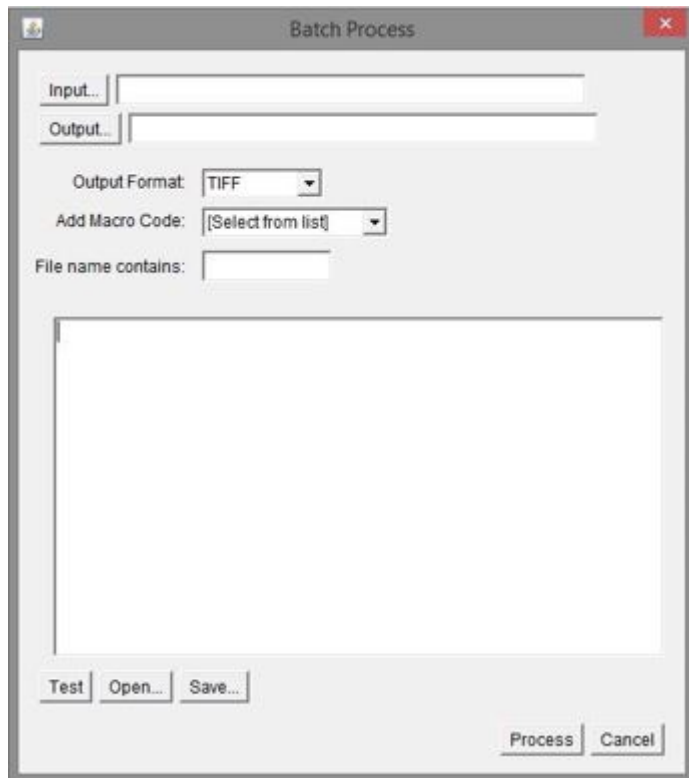
3. Para analizar un lote de imágenes, seleccione Process>Batch>Macro..., como se muestra en la figura.



4. Aparecerá la siguiente ventana en la cual usted deberá seleccionar los siguientes parámetros:

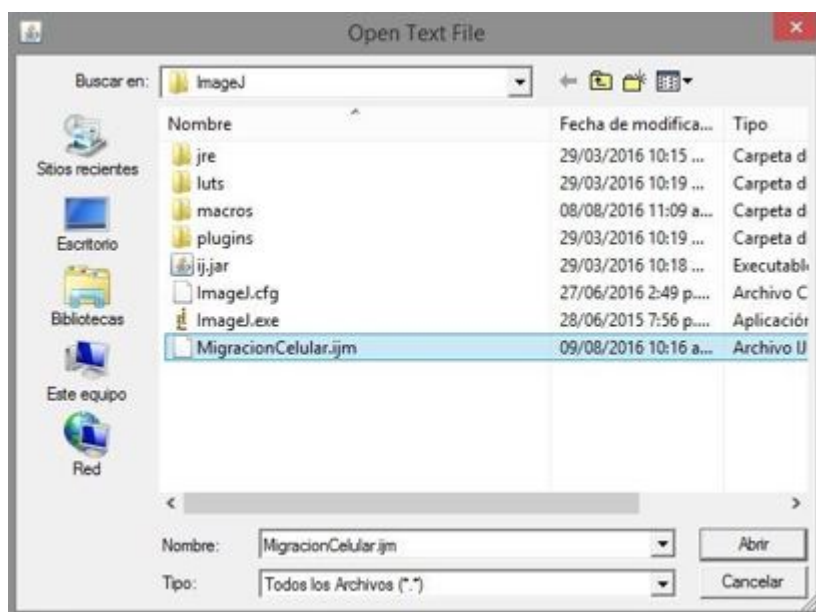
input, corresponde a la carpeta donde tiene las imágenes a analizar;

output, corresponde a la nueva carpeta donde quedará una copia de las imágenes después de ser analizadas.



5. Conserve Output Format como TIFF.

Add Macro Code sin modificar, presione la tecla Open para abrir el archivo del macro.



6. Ubique el archivo del macro *.ijm y ábralo. El programa automáticamente analizara las imágenes por usted y una vez haya terminado le aparecerá una ventana como la siguiente.

	Label	Area
1	4.1.jpg:0001-0684	610127
2	4.2.jpg:0001-0668	538645
3	4.2.jpg:0002-1288	21147
4	5.1.jpg:0001-0684	584975

En la tabla anterior se encuentran consignadas las áreas de cada herida, el software puede detectar más de una región y calcular el área para estas regiones, en este caso, el valor de área real generalmente es el valor más grande. Para validar esta información, analice nuevamente la foto manualmente, utilizando el mismo macro o utilizando el MRI Wound Healing Tool (http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Wound_Healing_Tool). Guarde los resultados en una hoja de calculo.

cmd **COMMAND (Flash)**

```
//run('Brightness/Contrast...');
run('Enhance Contrast', 'saturated=0.35');
run('Enhance Contrast', 'saturated=0.35');
run('Enhance Contrast', 'saturated=0.35');
run('Apply LUT');
run('32-bit');run('8-bit');
run('Subtract Background...', 'rolling=100 light');
run('Find Edges');
setOption('BlackBackground', true);
run('Convert to Mask');
run('Variance...', 'radius=3');
run('Invert');
setAutoThreshold('Default dark');
run('Threshold...');
setAutoThreshold('Default dark');
run('Close');
run('Analyze Particles...', 'size=10000-Infinity add');
roiManager('Measure');
run('Revert')
```

Macro de ImageJ para el análisis de imágenes

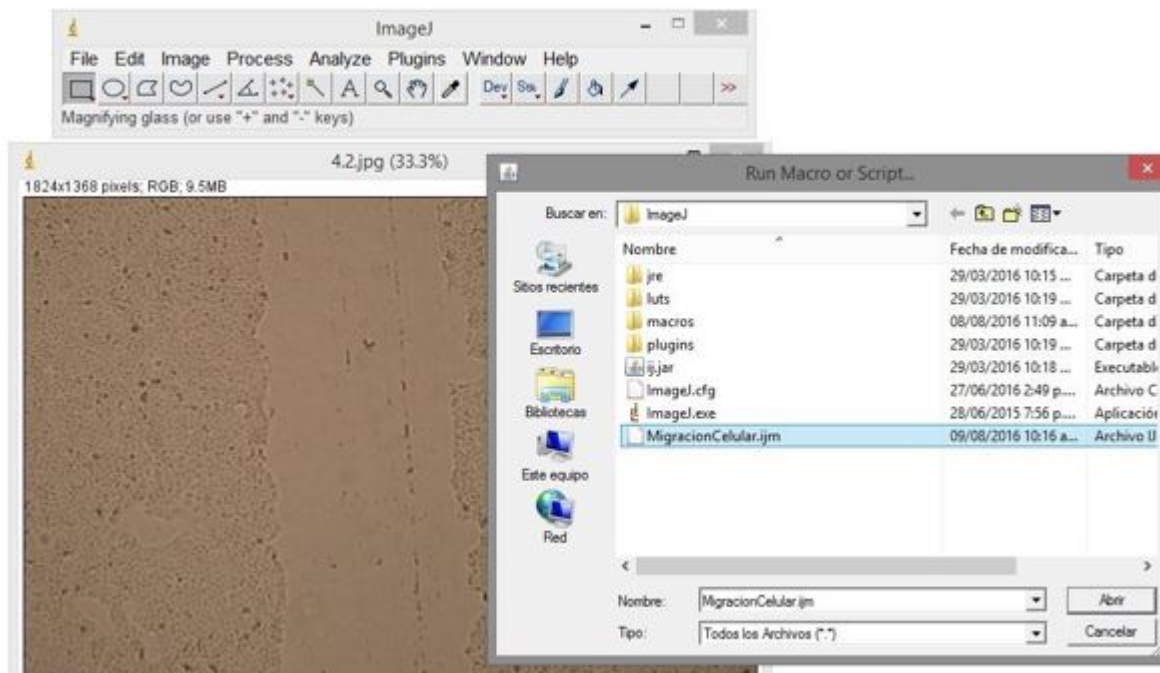
Analizar la foto mediante el macro GYMOL

Step 7.

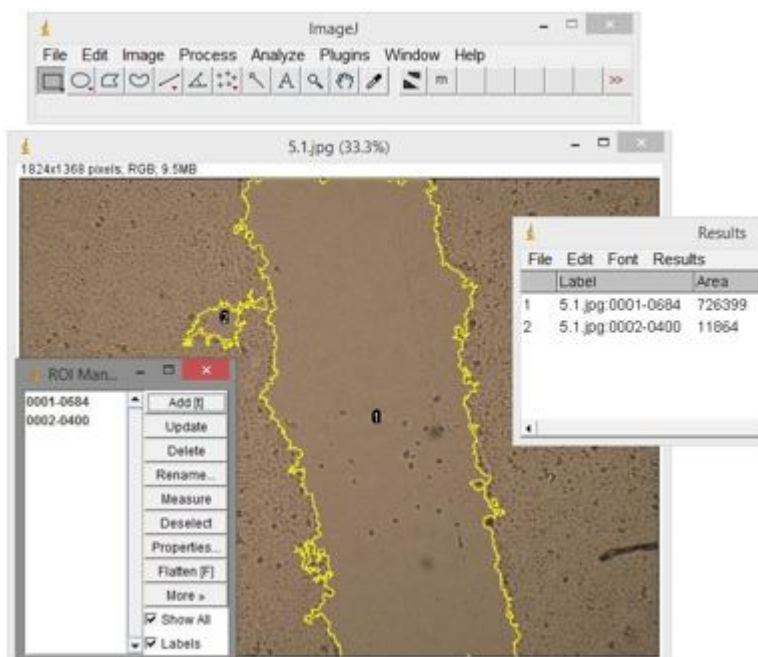
Si desea analizar de manera individual las imagenes puede seguir las siguientes instrucciones.

1. Abrir la imagen que desea analizar nuevamente arrastrándola al software ImageJ.

2. Seleccionar la opción **Plugins>Macros>Run** y seleccione el archivo de **MigracionCelularIndividual.ijm**.



3. Abrir el archivo y nuevamente le dará las medidas del área.



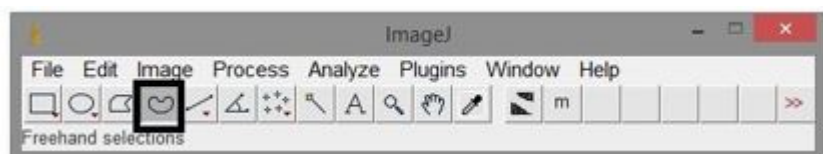
4. Seleccionar la medida del área que corresponde a la herida.

Analizar la foto de forma manual

Step 8.

en caso de que ninguno de los macros detecte adecuadamente las heridas se puede realizar la medida de forma manual siguiendo las siguientes instrucciones.

1. Arrastrar la imagen al ImageJ, seleccione la opción Freehand selection.



2. Presionar click izquierdo para realizar la selección del borde de la herida y dibuje el contorno de esta SIN SOLTAR EL CLICK, una vez se suelta el click, la selección se cierra automáticamente.



3. Una vez haya terminado de dibujar el contorno, presione Control + M, este comando traerá una ventana donde se muestra el área de la región seleccionada.

Análisis estadístico

Step 9.

Después de obtener el área de cierre de cada uno de los tratamientos, esta se debe expresar como porcentaje de cierre.

El porcentaje de cierre de la herida se obtiene de la siguiente forma:

- La medida de la herida se debe comparar en cada campo específico, con sigo mismo en el tiempo (como se indica en el paso 5 señalado en la figura con una 'X') y posteriormente se substraen las áreas para hallar el área migrada por cada campo a través del tiempo. Posteriormente, se hace una relación con respecto al total de la herida para hallar el porcentaje

de cierre por cada campo; obteniendo 4 medidas por pozo por triplicado, por lo tanto, 12 medidas por tratamiento por tiempo.

- Porcentaje de cierre = $((\text{área inicial} - \text{área X}) / \text{área inicial}) * 100$.

Una vez obtenido el porcentaje de cierre realizar el análisis estadístico:

1. Evaluar normalidad de los datos para cada grupo de tratamientos por medio de una prueba de D`Agostino y Pearson con un alfa de 0,05; una vez definida la normalidad en los datos, realizar un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con software PRISM (GraphPad, San Diego, CA) para observar si existe diferencias estadísticamente significativas entre los grupos y por último, hacer una comparación de medias mediante la prueba T Student comparando los tratamientos versus el control de medio de cultivo. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas para un valor de $P < 0,05$.

Warnings

Maneje todas las normas de bioseguridad a tener en cuenta para el manejo de materiales y reactivos de laboratorios de cultivo celular.