



EFFECTO DEL ESTRÉS DE ROCE EN CÉLULAS DE MELANOMA, SOBRE LA MIGRACIÓN ENDOTELIAL VASCULAR

Claudia Fernanda Fuentes Marchant, Andrea Angélica Muñoz Toro.

Profesor(es) guía: Andrés Ignacio Rodríguez

Morales, Eillen Romanet Torres Vallejos.

CHILLÁN, 2018







Contenido

ACRÓNIMOS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVO ESPECÍFICO	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
1. PROTOCOLO CULTIVO HUVEC.....	11
2. CAMBIO DE MEDIO.....	12
3. PROTOCOLO DE TRIPSINIZACIÓN Y PLAQUEO A WELLS.....	12
4. MONTAJE SHEAR STRESS.....	14
5. PROTOCOLO DE MIGRACIÓN	14
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
CONCLUSIÓN	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23
ANEXOS	25
1. ANEXO	25
2. ANEXO	27



ACRÓNIMOS

- UV: Radiación ultravioleta.
- UVA: Ultravioleta (onda larga).
- UVB: Ultravioleta (onda media).
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- HUVEC: cultivo de células endoteliales de la vena de cordón umbilical.
- RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute.
- ADO: Modulador inmunológico adenosina.
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
- PBS: Buffer fosfato salino.
- PCM: Medio condicionado pericito.

RESUMEN

El melanoma es un tipo de cáncer de piel, y dentro de estos es el más agresivo, incluso presentándose en otros epitelios como el intestino y ojos. El melanoma para poder alimentarse y oxigenarse requiere de un proceso llamado neovascularización, este ocurre por angiogénesis que es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de preexistentes. Dentro de los nuevos modelos de neovascularización no angiogénicos, se establece que las células de melanoma son capaces de interactuar directamente con el flujo sanguíneo y por lo tanto con las fuerzas vasculares hemodinámicas, las cuales son el estrés de roce, la tensión cíclica y la fuerza de presión. Por esto el objetivo de este trabajo es determinar el efecto de medios condicionados, derivados de células de melanoma, estimulados por estrés de roce, en la migración endotelial vascular. Para determinar esto se utilizó un método de cultivo de células endoteliales de la vena del cordón umbilical (huvec) a partir de las cuales se realizaron ensayos de migración endotelial por herida frente a diferentes medios condicionados los que se obtuvieron de la estimulación de células de melanoma por estrés de roce laminar y turbulento. Las imágenes de cierre de la herida se analizaron por el programa: Image J, a partir de esta metodología los resultados que se obtuvieron fue de medios de cultivos condicionados que permitieron establecer diferentes efectos de migración endotelial. Las imágenes muestran en todos los casos un cierre de la herida lento progresivo, pero no completo. Finalmente en los gráficos también se ve reflejado el cierre de las heridas en todos los medios, resaltando en ambos análisis una mayor y más rápida migración de las células que se encontraban en el medio turbulento por sobre las células con medio control y laminar, además estas últimas presentaron una migración casi nula. En conclusión los medios condicionados generados por estrés de roce en las células de melanoma si alteraron la migración de las células endoteliales, en comparación con el medio control.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un término que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos.¹ Normalmente las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita, cuando estas envejecen o dañan se induce su muerte, sin embargo en el cáncer este proceso se descontrola y en vez de producirse la apoptosis celular éstas siguen dividiéndose sin interrupción formando masas llamadas tumores. Los tumores que son cancerígenos son los malignos, los cuales tienen la capacidad de extenderse a los tejidos cercanos e invadirlos.

Dentro de las grandes variedades de cáncer que existen, el de piel es por mucho el más común, y dentro de este, el tipo más dañino es el melanoma, pues tiene más probabilidad de crecer y propagarse.² El Melanoma es un tipo cáncer de piel, que si bien es el menos común con respecto a la aparición es el más letal representando del 1% a 3% de todos los tumores malignos, este se trata de un tumor generalmente cutáneo, pero también puede producirse en el intestino y el ojo y ocurre cuando hay una concentración de melanocitos malignos. Los melanocitos son los encargados de segregar un pigmento llamado melanina el cual protege al organismo de los deterioros de la radiación UV.

Hasta ahora hay dos causas principales del melanoma; Exposición a la radiación UV de la luz del sol y las susceptibilidades genéticas. Las células epiteliales pueden absorber la luz de UVA y de UVB, que causa daños y perjuicios a los dímeros llamados ADN de la pirimidina

¹ Cáncer, OMS. (s.f.). OMS . Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

² Cáncer de piel (American Cancer Society , s.f., págs. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-piel.html>)



del ciclobutano. Las características de la piel de los individuos, incluyendo el color, pigmentación y edad en la exposición pueden también afectar al riesgo de melanoma. La incidencia más alta se considera en las poblaciones con la piel justa que viven en áreas con la alta exposición a la radiación ultravioleta de la luz del sol.

Hay también algunas mutaciones de gen específicas que se asocian a una susceptibilidad creciente para el melanoma. Una clase de mutaciones genéticas implica cambios al gen de CDKN2A, que altera la estabilidad del factor transcriptor p53 y causa el apoptosis relacionado con el cáncer. Los Individuos con una mutación en el gen de MC1R tienen un riesgo relativo dos a cuatro veces más arriba que la población en general de desarrollar el melanoma. Este gen es muy común y está presente en todas las piezas de la población con el pelo rojo.

Algunas de las células cancerígenas pueden moverse a lugares distantes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o sistema linfático y formar nuevos tumores lejos del original, lo que se conoce como metástasis. Estas células atraviesan directamente la matriz extracelular mediante la activación de metaloproteinas y la inhibición de cadherinas (uniones adherentes), llegando así al sistema circulatorio en donde promueven angiogénesis en las células endoteliales, utilizando este medio, además, para nutrir las células con el fin de incrementar en número, haciendo más grande el tamaño del tumor.

Con el fin alimentar y oxigenar al melanoma altamente proliferativo se requiere un proceso de neovascularización del tejido circundante. Normalmente la producción de neovascularización celular ocurre mediante un proceso llamado angiogénesis. El proceso de angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de preexistentes, para esto hay factores (moléculas) que la promueven y dentro de los más importantes se

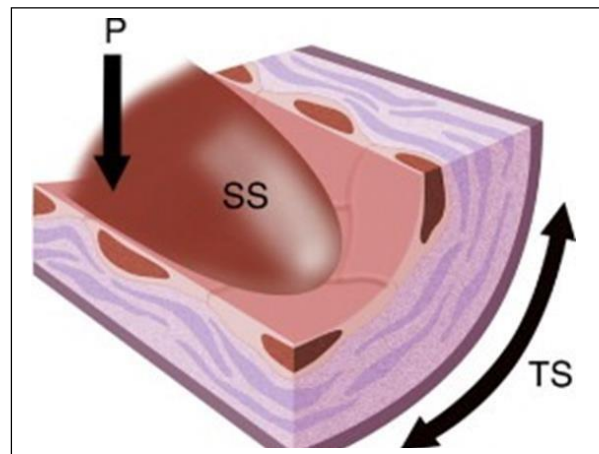
encuentran el modulador inmunológico adenosina (ADO) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Durante muchos años, se pensó que la vascularización tumoral progresaba principalmente por un mecanismo angiogénico mediado sólo por células endoteliales. Sin embargo, desde finales de los 90s, surgieron los conceptos de una microcirculación independiente del modelo clásico de angiogénesis, tales como la invasión vascular, vasculogénesis y mimetismo vascular entre otros. Se ha reportado que el mimetismo vascular está asociado con la agresividad tumoral de varios tipos de melanoma. En el caso de mimetismo vascular y vasculogenesis se establece que las células de melanoma son capaces de interactuar directamente con el flujo sanguíneo y por lo tanto con las fuerzas vasculares hemodinámicas, las cuales son el estrés roce, la tensión cíclica y la fuerza de presión.

El vaso sanguíneo es una estructura hueca y tubular que conduce la sangre impulsada por la acción del corazón, está compuesto por 3 túnicas; la interna en la cual se encuentra el endotelio, la membrana basal y la lámina elástica interna; la siguiente es la túnica media, contiene el musculo liso y la lámina lisa y finalmente la última túnica es la externa. El vaso está expuesto a flujo sanguíneo el cual consta de 3 diferentes fuerzas hemodinámicas (estrés de roce, cíclica y presión).

Estrés de roce (SS): Fuerza paralela a la célula.

Tensión Cíclica (TS): Fuerza de estiramiento.

Fuerza de Presión (P): Fuerza hacia afuera, dada por la presión sanguínea.



En situación fisiológico, el estrés de roce experimentado por el endotelio es una función de la presión “axial”, que se produce cuando la sangre fluye a través del vaso y es del orden de 0- 5 N/m². El estrés de roce produce una amplia gama de eventos bioquímicos intracelulares tales como: cambios de la orientación de la célula con la dirección del flujo, distribución del citoesqueleto de la célula, producción de sustancias vasoactivas y mejora de la adhesión celular, detención mitótica, supervivencia celular, metabolismo de la glucosa hacia un camino más anaeróbico, formación estrecha de la ensambladura, la expresión de las enzimas asimétricamente localizadas y de los sistemas de transporte mediados por portadores que engendran un fenotipo verdaderamente polarizado del endotelio. En resumen esta es una fuerza hemodinámica que es particularmente importante porque estimula la liberación de sustancias vasoactivas y cambia la expresión génica, el metabolismo y la morfología celular.³

Por lo tanto el estrés de roce podría tener un impacto potencial en aquellas células de melanoma que logran atravesar la matriz extracelular y ubicarse en la pared interna del vaso sanguíneo. Actualmente hay escasa información sobre el efecto directo de las fuerzas de estrés de roce sobre el fenotipo de melanoma y la señalización derivada de este. En consecuencia, el principal objetivo de esta propuesta es determinar el efecto directo de las fuerzas de estrés de roce, y ver si existen en liberación de sustancias al medio que sean capaces de promover o inhibir angiogénesis endotelial.

³ (Vascular biology lab , s.f., págs. <http://bio.au-kbc.org/faculty/suvro/SS-modf.htm>)



HIPÓTESIS

El estrés de roce en células de melanoma genera estímulos que alteran la migración celular.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de medios condicionados derivados de melanoma estimulados por estrés de roce, en la migración endotelial vascular.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- ✓ Generar estímulos (laminar y turbulento) por estrés de roce en células de melanoma B16F10.
- ✓ Obtener medios condicionados desde células de melanoma estimuladas por estrés de roce.
- ✓ Estimular células endoteliales con medios condicionados derivados de melanoma.
- ✓ Analizar el efecto de medios condicionados sobre la migración de células endoteliales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PROTOCOLO CULTIVO HUVEC.

Este procedimiento se realizó para obtener células endoteliales para ser utilizadas en posteriores ensayos, y se ejecutó de la siguiente forma:

Primero se debe encender cámara de flujo laminar, rociar con etanol al 70% y limpiar, se introduce todo el material en la cámara para luego encender el UV por 15 min, luego se coloca una bolsa dentro de la bandeja de desechos orgánicos junto a la cámara. Después se introduce el cordón dentro de la bandeja, se seca con papel absorbente y con pinza anatómica ubicar la vena umbilical de algunos de los extremos, se introduce la cánula en la vena umbilical y se amarra firme con el hilo de volantín. Posteriormente se coloca cera de 60 ml de PBS tibio en el vaso precipitado estéril, se lava suavemente la vena con 40 ml de PBS conectando la jeringa a la cánula, luego se debe canular el otro extremo y lavar con 20 ml de PBS. Se introduce colagenasa tipo 2 en una jeringa se conecta en un extremo y la otra jeringa en el otro extremo y eliminar el PBS que queda dentro del lumen de la vena, se debe hacer pasar de un lado a otro la colagenasa hasta que la vena quede llena. Se sitúa el cordón sobre papel de aluminio y se coloca en la estufa a 37°C por 10 min, mientras la colagenasa actúa se debe limpiar el área de trabajo y colocar dentro de la campana dos tubos de 15ml estériles con etanol. Pasado los 10 min del cordón dentro de la estufa este de recuesta y se comienza a masajear suavemente, después con una jeringa en alto y otra abajo, se hace fluir la colagenasa de un extremo a otro un par de veces, para poder arrastrar todas las células desprendidas. Se aspira la colagenasa por uno de los extremos y se vacía a un tubo falcón de 15 ml, después colocar más menos 10 ml de PBS en el cordón y masajear nuevamente, realizar el mismo procedimiento que con la colagenasa y colocar en el mismo tubo que se había recolectado la colagenasa que se recuperó del cordón. Se debe tapar el tubo falcón y centrifugar a 1400rpm por 10 min. Mientras se centrifuga, limpiar el área de trabajo, colocar una placa de 60mm de diámetro y poner más menos 20 ml de gelatina. Pasado los 10 min



retirar el tubo de la centrifuga y eliminar el sobrenadante por el lado contrario al del pellet, agregar 2 ml de PCM y repipear 5 a 8 veces para soltar bien las células. Se debe eliminar la gelatina que queda en la placa de 60mm y agregar las células tapar bien y rotular. Se coloca la placa dentro de la incubadora y dejar de 24 a 48 horas para recambio de medio, por último limpiar el área de trabajo y lavar material sucio.

2. CAMBIO DE MEDIO

24 a 48 horas posterior al cultivo celular, las células deben ser lavadas, verificando la confluencia bajo microscopio (deben llegar al 90% como máximo) se cambia el medio si la confluencia es baja. Caso contrario plaquear a una placa de 100.

Se coloca a entibiar PBS estéril y PCM, antes de utilizar la cámara se debe limpiar con etanol y dejar en UV por 10 min, posterior a eso se enciende la cámara de flujo laminar e introducimos la plaza, PBS, PCM tibios y un vaso de precipitado para eliminar desechos. Destapar la placa, sin tocar la boca del frasco de PBS 1X (estéril) con la placa, dejar que el PBS 1X caiga muy lentamente en la placa, tratando de que quede inclinada. Con movimientos suaves y circulares lavar 3 veces las células, luego se miran al microscopio para verificar confluencia. Finalmente dejar 2 ml de PCM para placa de 60 o 5 ml para placa de 100 ml (depende del cordón: patológico, normal, placenta y el tipo de PCM)

3. PROTOCOLO DE TRIPSINIZACIÓN Y PLAQUEO A WELLS

Una vez que la placa de 100mm ha alcanzado un 90% de confluencia las células deben ser plaqueadas para evitar que se despeguen. Para ello seguimos con el siguiente procedimiento:

Se pone a descongelar a temperatura ambiente 1ml de tripsina al 1%, luego se lavan las células y después de haber lavado 2 veces con PBS 1X se incuba con el ml de tripsina por 2-3 minutos a 37°C. Posteriormente se saca de la incubadora y se da un golpe firme para soltar las células y se observa al microscopio. Enseguida se coloca 1ml de PCM para recuperar las células de la placa. Posteriormente con una micro pipeta se agregan las células suspendidas a las Wells, se agita suavemente para homogeneizar las células.



Se rodean las Wells con un volumen equivalente de PBS estéril para mantener humedad de Well, se debe incubar en la estufa toda la noche, al día siguiente se verifica el crecimiento celular y disponerse a realizar el experimento. Debe haber un crecimiento a confluencia máxima.



4. MONTAJE SHEAR STRESS

Para obtener el medio condicionado de las células de melanoma murino (B16F10), estas fueron sometidas a flujo laminar, turbulento y control con el siguiente procedimiento:

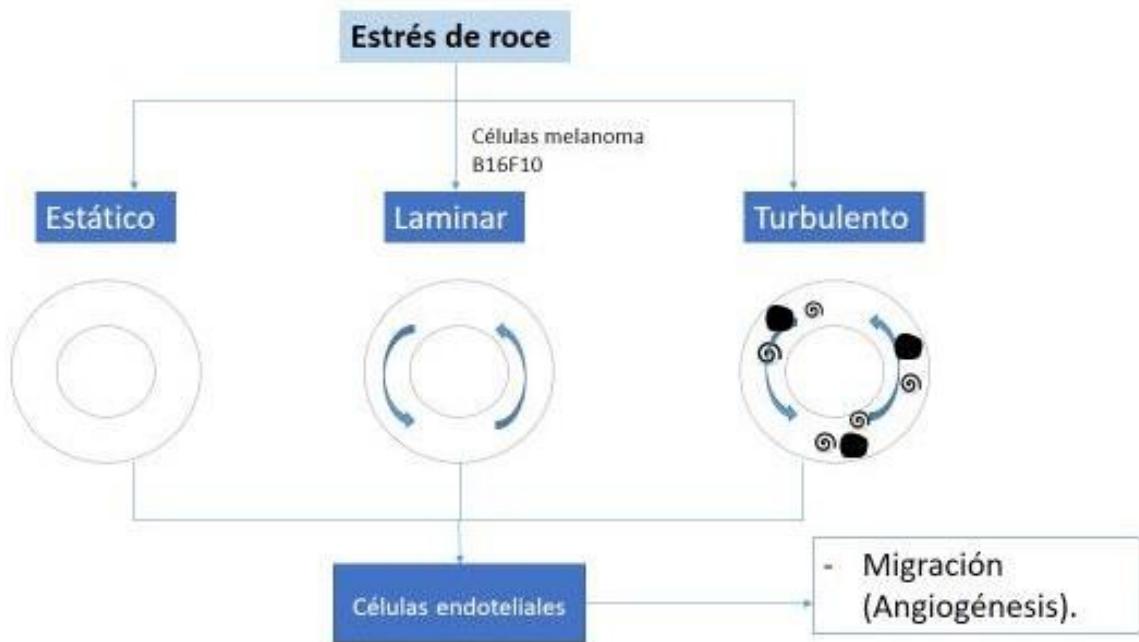


Figura 1: Esquema de obtención de medios condicionados, estático, laminar y turbulento.

5. PROTOCOLO DE MIGRACIÓN

✓ SCRATCH

Migración celular: Para averiguar si los medios condicionados obtenidos con las células de melanoma (B16F10) estimulado por estrés de roce laminar y turbulento aumentan *in vitro* la migración de células endoteliales se realizará un ensayo de herida. Para esto, se siembran



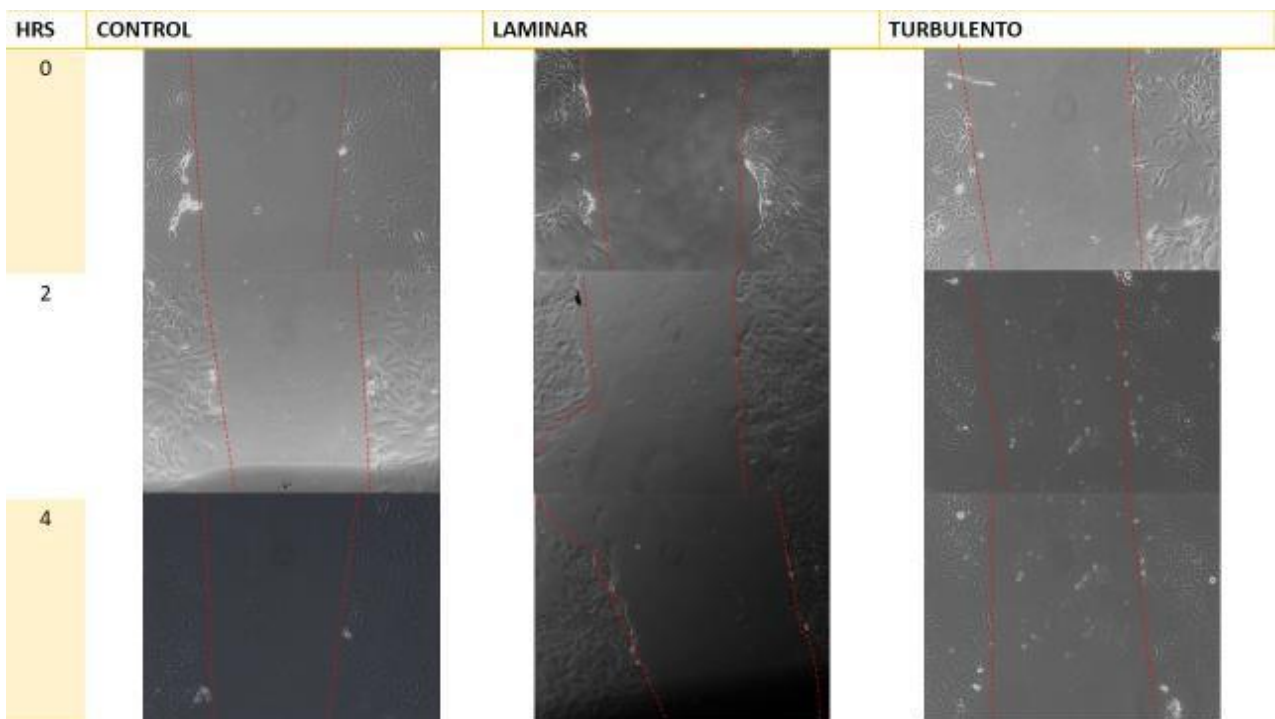
las células HUVEC en placas de 24 pocillos, complementando el volumen con PCM. Cuando están 100% confluentes, las células se lavan y privan de suero durante la noche, transcurrido este tiempo se realizó el raspado con una punta amarilla 200 ml (los pocillos se lavan con PBS 1x), luego se agregan 200 μ L del medio de cultivo condicionado (laminar, turbulento y control) que se obtuvo en el ensayo de estrés de roce con las células de melanoma, se deja incubar por 24 horas. Posteriormente se realizó un seguimiento de la migración con imágenes de raspado las cuales se capturaron con microscopio a diferentes horas (0, 2, 4, 7, 20, 30) con una ampliación de 10x.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se utilizó el software GraphPad Prism para los análisis estadísticos. Los resultados de este estudio se compararán por ANOVA de dos vías, seguido por el post-test de Tukey's para la comparación múltiple de los datos. El nivel de significancia utilizado fue $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de realizar el experimento de migración por SCRATCH que consistió en producir una herida a células endoteliales que se encontraban en diferentes medios condicionados (control, laminar y turbulento) y realizar una evaluación al ensayo desde la hora 0, hasta la hora 30; se obtuvieron los siguientes resultados:



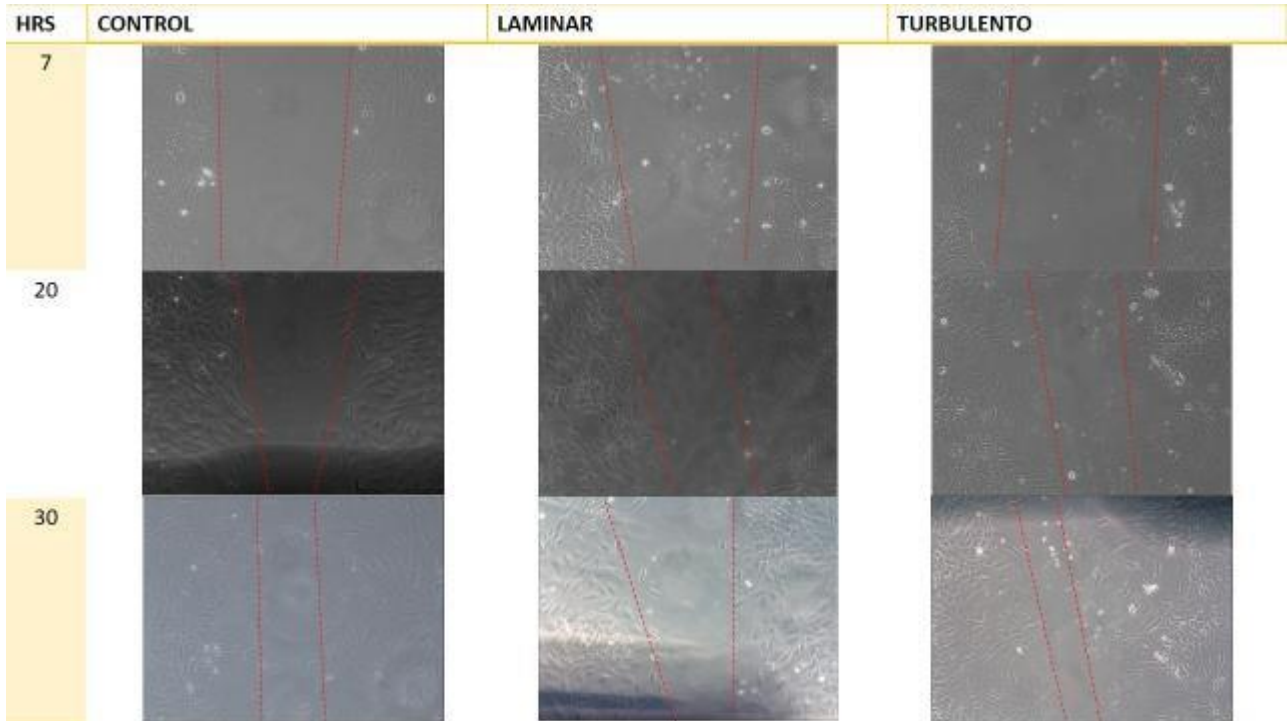


Figura 2: Imágenes del progreso de ensayo migratorio. 10x

Como se puede apreciar en las imágenes anteriores, a simple vista se demuestra que hay una evolución positiva al cierre de la herida producida a las células endoteliales, en todos los medios, pues esta se comienza a cerrar progresivamente hasta llegar a la hora 30 en donde se puede ver un cierre casi completo. A pesar de esto no es posible saber verdaderamente si estos datos son coherentes, debido a que al momento de tomar fotografías es difícil obtener imágenes de la misma zona de la herida en cada hora, esto, producto de que el microscopio no posee la capacidad de enfocar la totalidad de la placa para apreciar la herida por completo, teniendo que realizar la toma de fotografías en distintas partes de la herida con un aumento de 10x. Al momento de comparar el avance del cierre de la herida en los diferentes medios (control, laminar y turbulento) se pudo observar que las células que estuvieron expuestas al medio con flujo turbulento tuvieron un mayor cierre de la herida a

la hora 30, en comparación con las células de los otros dos medios a la misma hora, además se puede apreciar que el migración de las células en medio turbulento es más anárquico que el de las otras células que se encuentran en el medio laminar y control.

Luego de realizar el análisis general a las imágenes obtenidas se procedió a estudiarlas mediante un programa computacional (Image J) para realizar mediciones del diámetro de las heridas que se hicieron en los diferentes medios e inspeccionar si estas fueron cerrando con el transcurso de las horas 0, 2, 4, 7, 20, 30 (ejemplo imagen anexo 1), con esto podremos corroborar si hubo migración de las células hacia el centro de la herida y además analizar cuál de los medios condicionados tuvo un mayor efecto sobre esta. Dando paso a los siguientes resultados:

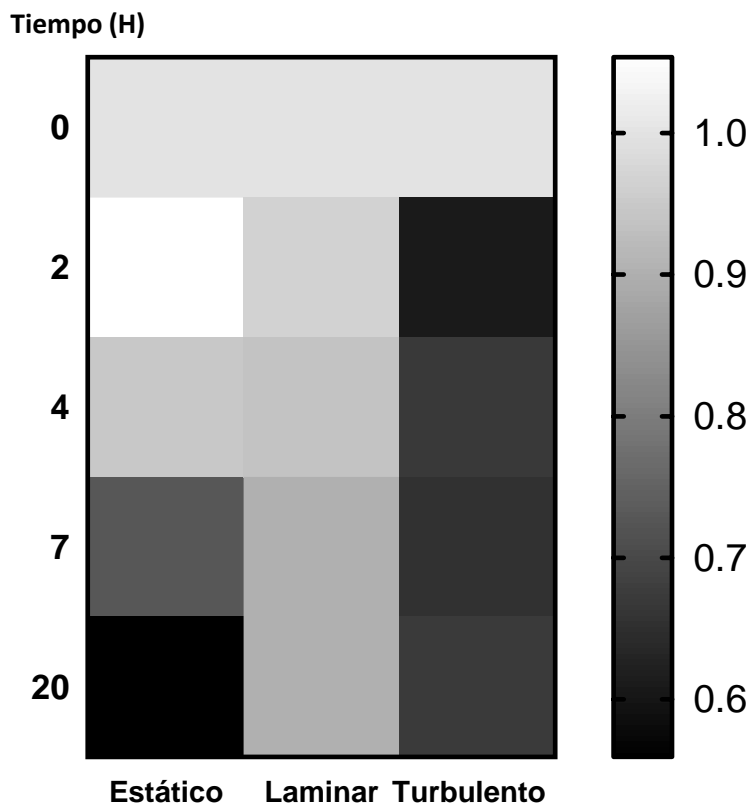


Figura 3: Heat map del efecto de los medios condicionados sobre el cierre de la herida.

El gráfico heat map muestra la diferencia del efecto de los medios condicionados sobre el cierre de la herida, en donde el color más oscuro representa un mayor cierre de esta. Al analizar los resultados de la figura 3 se puede observar que las células endoteliales encontradas en el medio con flujo laminar tuvieron una muy baja migración hacia el cierre de la herida, en cambio las células que poseían el medio turbulento obtuvieron un mayor cierre de la herida y con más rapidez. Al comparar las células de estos medios condicionados con las células del medio control se observó en estas últimas que el cierre de la herida fue más continuo y coherente a través de las horas.

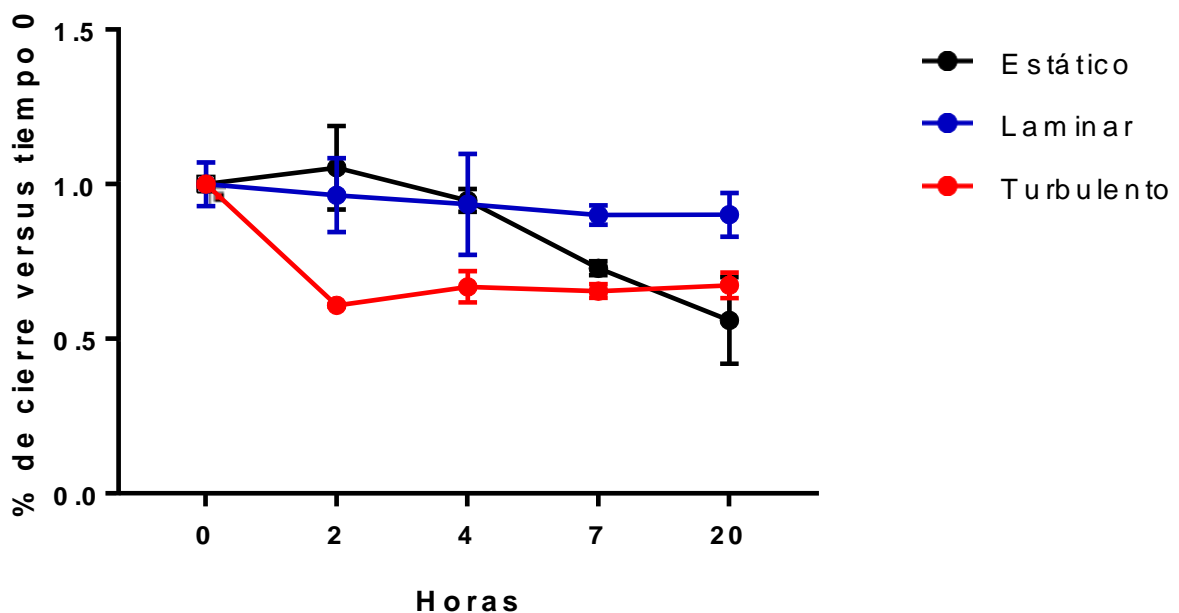


Figura 4: Gráfico de líneas del efecto de los medios condicionados sobre el porcentaje del cierre de la herida en relación al tiempo 0. (Análisis estadístico en anexo 2)

En relación a la figura número 4 se puede observar que las células endoteliales tuvieron una variación con relación al tiempo, es decir, mientras pasaban las horas el porcentaje de cierre fue disminuyendo en todos los casos, esto nos indica que la herida fue cerrando haciendo suponer que las células están migrando hacia el espacio vacío que dejó la herida. Respecto a los diferentes medios en donde se encontraban las células endoteliales podemos decir que la influencia de estos en la angiogénesis fue diferente en el flujo laminar y turbulento en comparación con el medio control. Según el análisis estadístico utilizado para comparar la hora 0 con los diferentes tiempos evaluados (2, 4, 7, 20) en cada medio, se pudo observar en los resultados que las células endoteliales que se encontraban en el medio turbulento tuvieron un avance del cierre de la herida estadísticamente significativo comparando la hora 0 con cada tiempo. En cambio las células que se encontraban en el medio con flujo laminar no presentaron diferencias estadísticamente significativas en todos los casos, además tuvieron un porcentaje de cierre casi nulo y muy lento.

En la figura 4 se observa que las células endoteliales que se encontraban en el medio control tuvieron un comportamiento diferente y mejor de lo esperado con relación a los medios condicionados, esto se ve reflejado en los resultados obtenidos de los gráficos, en donde se demuestra que estas células tienden a tener un cierre continuo y progresivo, aunque no tan rápido como se pudo observar en el caso de las células endoteliales del medio con flujo turbulento, pero en cambio esta sí obtuvo un mayor cierre de la herida que estas últimas en el análisis de la hora 20. El análisis realizado arrojó diferencias estadísticamente significativas solo al comparar el tiempo 0 con el tiempo 7 y 20.

Según los resultados arrojados en los gráficos al relacionarlos con las imágenes del microscopio presentan algunas diferencias, como por ejemplo en el control estático, en donde se ve que los gráficos presentan un aumento del tamaño de la herida a la hora 2 lo que no se aprecia a simple vista en la figura 2. Otro caso sería las células endoteliales que se encuentran en el medio laminar en donde los gráficos demuestran que hay un progresivo, pero muy leve cierre de la herida a diferencia de la figura 2 en donde se observa una



migración celular evidente. En cuanto al medio turbulento se puede observar que en los gráficos hay un cierre de la herida drástico a la hora 2 el que luego en el transcurso del tiempo se mantiene con pocas variaciones, lo que no es consecuente con las imágenes de la figura 2 en donde se aprecia un cierre lento y continuo, similar al medio control.

Al comparar en forma general los gráficos con las imágenes obtenidas del microscopio no se observa una coherencia, esto se puede deber a un error en la obtención de muestra de la imágenes, en la entrada de luz natural hacia el microscopio, el no ser posible la obtención de imágenes en la misma zona de la herida en cada una de las horas analizadas y/o el análisis de las imágenes, pues el programa utilizado para la medición pudo no ser el correcto.

En las metodologías descritas en trabajos científicos sobre migración la mayoría de estos análisis obtienen un cierre de la herida en aproximadamente 24 horas, a diferencia de los resultados descritos anteriormente en este trabajo en donde se demuestra que a la hora 20 no hubo un cierre significativo. Esta diferencia puede ser porque las células endoteliales estaban sometidas en medio RPMI (medio de células de melanoma murino), el cual podría no ser el adecuado para estas.

Finalmente decir que no se tomó en consideración las fotografías de la hora 30 en los análisis computaciones, esto producto de que los resultados de estas mediciones no fueron los más coherentes para la realización de las gráficas, debido a una presunta muerte celular.

CONCLUSIÓN

- Los estímulos generados por estrés de roce en las células de melanoma, permitieron obtener los medios condicionado que fueron utilizados para lograr establecer las diferencias entre el efecto del estrés de roce laminar y turbulento con respecto al control.
- Se realizó un ensayo de cierre de herida en células endoteliales, frente a los diferentes medios condicionados. En Las fotografías de la migración se observó que claramente hay un cierre progresivo en el transcurso del tiempo en todos los tratamientos realizados. El que fue visualmente más notorio en el tratamiento turbulento en comparación con el medio condicionado laminar.
- Las imágenes que se analizaron en el programa Image J demuestran que si hubo un cierre progresivo de la herida representada por el porcentaje de cierre, en donde la migración fue estadísticamente significativa en el medio condicionado turbulento, seguido del medio control. Lo que en general es concordante con las imágenes de microscopia. En contraste en el análisis específico hora por hora se observan algunas diferencias entre las imágenes del microscopio y los gráficos.
- En base a los resultados obtenidos mediante diferentes análisis se acepta la hipótesis, debido a que los medios condicionados si poseen un efecto sobre la migración de las células endoteliales, este efecto varía en el flujo laminar y turbulento, viéndose más beneficiadas la migración en este último en comparación con el medio control.

BIBLIOGRAFÍA

Teoría.

1. Cáncer,OMS.(s.f.).OMS.Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
2. Cáncer de piel (American Cancer Society , s.f., págs. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-piel.html>)
3. Vascular biology lab , s.f., págs. <http://bio.au-kbc.org/faculty/suvro/SS-modf.htm>
4. Chung, H.J. and M. Mahalingam, Angiogenesis, vasculogenic mimicry and vascular invasion in cutaneous malignant melanoma - implications for therapeutic strategies and targeted therapies. Expert Rev Anticancer Ther, 2014. 14(5): p. 621-39.
5. Funcional, D. E. P. Fisiología. (s.f.). Células endoteliales. Recuperado de <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/endotelial.php>

Materiales y métodos.

1. de Aguiar, R.B., et al., Blocking FGF2 with a new specific monoclonal antibody impairs angiogenesis and experimental metastatic melanoma, suggesting a potential role in adjuvant settings. Cancer Lett, 2016. 371(2): p. 151-60
2. Casanello, P., A. Torres, et al. (2005). "Equilibrative nucleoside transporter 1 expression is downregulated by hypoxia in human umbilical vein endothelium." Circulation research 97(1): 16-24.
3. dela Paz, N.G., et al., Role of shear-stress-induced VEGF expression in endothelial cell survival. J Cell Sci, 2012. 125(Pt 4): p. 831-43.
4. Maul, T.M., et al., Mechanical stimuli differentially control stem cell behavior: morphology, proliferation, and differentiation. Biomech Model Mechanobiol, 2011. 10(6): p. 939-53.
5. Escudero, C., et al., Impaired A2A adenosine receptor/nitric oxide/VEGF signaling pathway in fetal endothelium during late- and early-onset preeclampsia. Purinergic Signal, 2013. 9(2): p. 215-26.
6. Jin, L., et al., miR-125b is associated with renal cell carcinoma cell migration, invasion and apoptosis. Oncol Lett, 2017. 13(6): p. 4512-4520.
7. Arnaoutova, I. and H.K. Kleinman, In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. Nat Protoc, 2010. 5(4): p. 628-35.

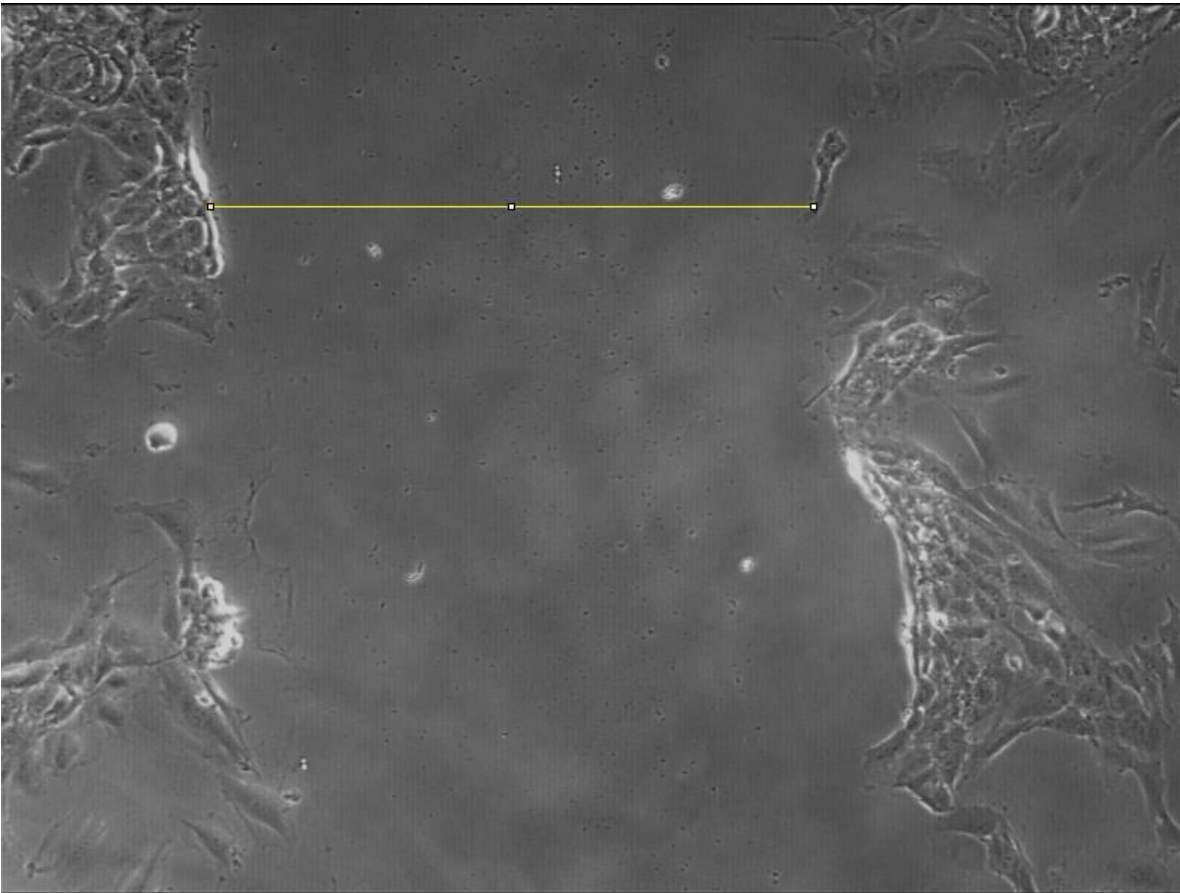


8. DeCicco-Skinner, K.L., et al., Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis. *J Vis Exp*, 2014(91): p. e51312.
9. Babica, P., I. Sovadinova, and B.L. Upham, Scrape Loading/Dye Transfer Assay. *Methods Mol Biol*, 2016. 1437: p. 133-44.

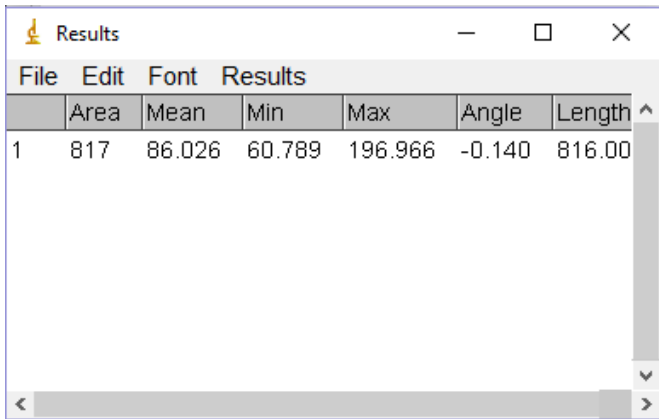
ANEXOS

1. ANEXO

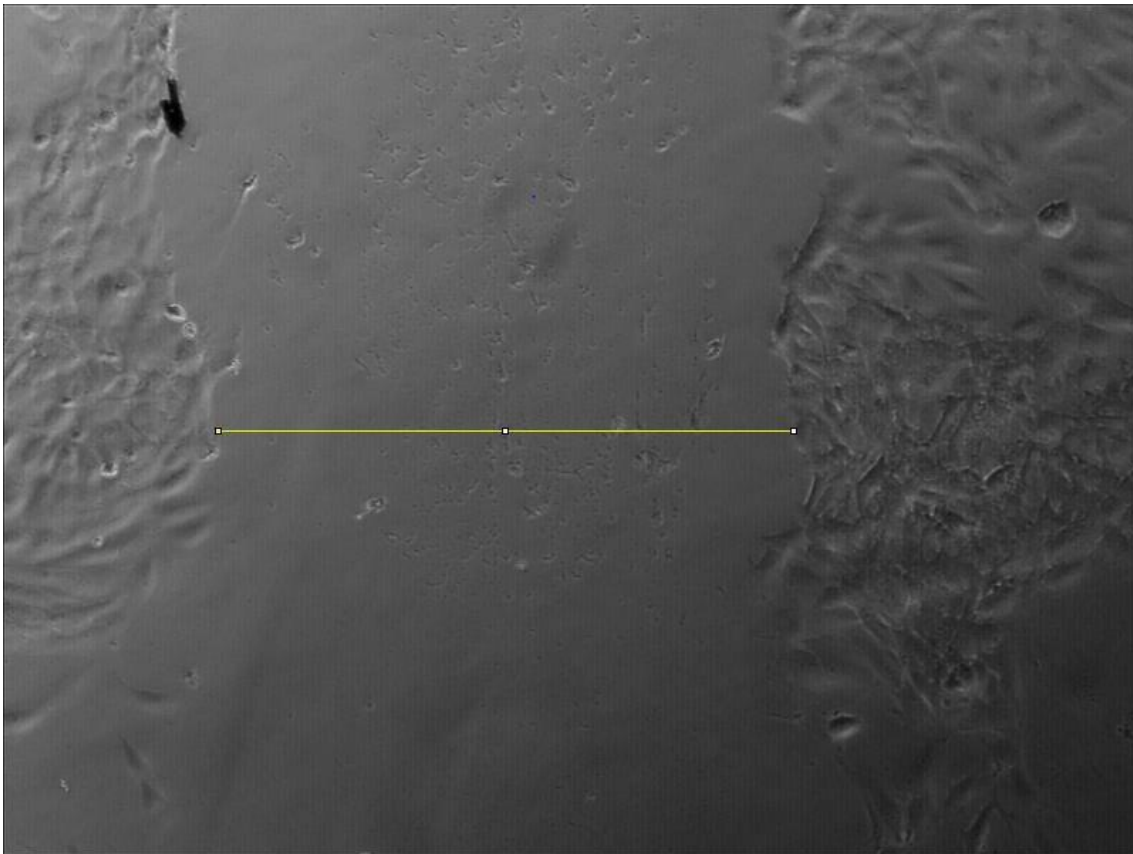
Imágenes de análisis del programa imagen J para determinar el progreso del cierre de la herida de las células endoteliales en los diferentes medios condicionados.



Hora 0, flujo laminar.



	Area	Mean	Min	Max	Angle	Length
1	817	86.026	60.789	196.966	-0.140	816.00



Hora 2, flujo laminar.



File	Edit	Font	Results			
	Area	Mean	Min	Max	Angle	Length
1	811	84.942	60	125	0	810

2. ANEXO

ANOVA de dos vías y un post-test de Tukey's, en donde * es el nivel de significancia.

Within each column, compare rows (simple effects within columns).

Number of families	3
Number of comparisons per family	10
Alpha	0,05

Estático

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 2	-0,05306	-0,1825 to 0,0764	No	ns	0,7817
0 vs. 4	0,05253	-0,07692 to 0,182	No	ns	0,7879
0 vs. 7	0,2716	0,1421 to 0,401	Yes	****	<0,0001
0 vs. 20	0,4408	0,3114 to 0,5703	Yes	****	<0,0001
2 vs. 4	0,1056	-0,02387 to 0,235	No	ns	0,1629
2 vs. 7	0,3246	0,1952 to 0,4541	Yes	****	<0,0001
2 vs. 20	0,4939	0,3644 to 0,6233	Yes	****	<0,0001
4 vs. 7	0,219	0,08959 to 0,3485	Yes	****	<0,0001
4 vs. 20	0,3883	0,2588 to 0,5178	Yes	****	<0,0001
7 vs. 20	0,1693	0,03981 to 0,2987	Yes	**	0,0042



Laminar

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 2	0,03504	-0,09442 to 0,1645	No	ns	0,9421
0 vs. 4	0,0648	-0,06466 to 0,1943	No	ns	0,6301
0 vs. 7	0,09947	-0,02999 to 0,2289	No	ns	0,2112
0 vs. 20	0,09858	-0,03087 to 0,2289	No	ns	0,219
2 vs. 4	0,02976	-0,0997 to 0,1592	No	ns	0,9675
2 vs. 7	0,06443	-0,06503 to 0,1939	No	ns	0,6352
2 vs. 20	0,06355	-0,06591 to 0,1939	No	ns	0,6472
4 vs. 7	0,03467	-0,09479 to 0,1645	No	ns	0,9442
4 vs. 20	0,03379	-0,09567 to 0,1632	No	ns	0,949
7 vs. 20	-0,0008826	-0,1303 to 0,1286	No	ns	>0,9999

Turbulento

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 2	0,3919	0,2624 to 0,5214	Yes	****	<0,0001
0 vs. 4	0,3313	0,2019 to 0,4608	Yes	****	<0,0001
0 vs. 7	0,345	0,2156 to 0,4745	Yes	****	<0,0001
0 vs. 20	0,327	0,1976 to 0,4565	Yes	****	<0,0001
2 vs. 4	-0,06059	-0,19 to 0,06887	No	ns	0,6869
2 vs. 7	-0,04687	-0,1763 to 0,08258	No	ns	0,849
2 vs. 20	-0,06486	-0,1943 to 0,0646	No	ns	0,6293
4 vs. 7	0,01372	-0,1157 to 0,1432	No	ns	0,9983
4 vs. 20	-0,004268	-0,1337 to 0,1252	No	ns	>0,9999
7 vs. 20	-0,01798	-0,1474 to 0,1115	No	ns	0,9951