



# **Efecto de estrés de roce sobre el fenotipo morfológico en células de melanoma.**

## Integrantes:

- Carla Mora Peña.
- Ignacio Rebolledo Fuentes.

## Profesor Guía:

- Andrés Rodríguez Morales.

## Asistente de investigación

- Eillen Torres Vallejos.

## Financiamiento:

- Proyecto interno UBB 1667093 3/R 2016

## **Efecto de estrés de roce sobre el fenotipo morfológico en células de melanoma.**

### **Resumen**

El estrés de roce es la fuerza ejercida por el flujo sanguíneo en las paredes de los vasos sanguíneos. Este estrés genera una respuesta en la pared vascular, caracterizada por la liberación de mediadores endoteliales. El estrés de roce depende varios factores algunos de estos son la forma, la presión vascular y la turbulencia del flujo sanguíneo, entre otros factores.

El melanoma es un tipo cáncer de piel, es el menos común con respecto a la aparición pero es el cáncer de piel más letal. En general, el melanoma representa de 1% a 3% de todos los tumores malignos. La información sobre epidemiología del melanoma es escasa en Chile, sin embargo se ha reportado que la incidencia y la mortalidad del melanoma maligno han aumentado en las últimas décadas. Los factores de riesgo para el melanoma incluyen factores genéticos y ambientales.

La angiogénesis juega un papel fundamental en el crecimiento del melanoma y metástasis. Incluso con algunos de los inductores proangiogénicos más importantes conocidos, hay una falta de conocimiento sobre el papel de las fuerzas hemodinámicas en la angiogénesis tumoral. Por lo tanto el objetivo general de nuestro trabajo es investigar si las fuerzas estrés de roce inducen cambios en las células de melanoma induciendo un fenotipo endotelial.

Para lograr cumplir este objetivo la metodología que fue utilizada fue un diseño de placas de cultivo celular para generar estrés de roce laminar y turbulento incluyendo en este último obstáculos y un respectivo control estático. Posterior a este ensayo, las células se analizaron por el software imagen j, para observar la orientación celular.

Finalmente los resultados indicaron que en los gráficos de histograma de frecuencia se observan diferencias en la distribución de ángulo entre los diferentes medios utilizados en el experimento, mientras que en los gráficos de box plot también se evidencian diferencias siendo estas estadísticamente significativas comparando el control con ambos tratamientos, así también entre los tratamientos. Finalmente logramos concluir que el flujo laminar y turbulento presentaban diferencias en la orientación de sus células, lo cual lleva a que las células sometidas a estrés de roce turbulento presenten una menor coherencia en la orientación de los núcleos en comparación al flujo laminar

Gracias a los diferentes experimentos realizados, las observaciones y la aplicación de programas de análisis, finalmente se concluye que las fuerzas de estrés de roce activan un cambio de fenotipo del citoesqueleto en las células de melanoma

## **Introducción**

### **Estrés de Roce**

El estrés de roce (SS) se define como la fuerza ejercida por el flujo sanguíneo en las paredes de los vasos sanguíneos. Este estrés genera una respuesta en la pared vascular, caracterizada por la liberación de mediadores endoteliales, que a su vez estimulan el remodelado estructural a través de la regulación de la expresión génica y, en consecuencia, la síntesis de proteínas SS depende del diámetro interno del vaso, el caudal sanguíneo, la viscosidad de la sangre y la pulsatilidad del flujo sanguíneo. Sin embargo, está claro que las SS dependen también de la forma, la presión vascular y la turbulencia del flujo sanguíneo, entre otros factores. En el caso de la función endotelial, varios informes han investigado el impacto del estrés de roce (SS) sobre la expresión génica y la regulación vascular general. En cuanto a los procesos de angiogénesis, Wragg y colaboradores (2014) indicaron que las células endoteliales expuestas a diferentes niveles de tensión de estrés de roce laminar (LSS) generan un aumento en varios genes pro-angiogénicos. Los fluidos dentro de sistemas cerrados biológicos (como vasos sanguíneos, tubos renales) ejercen un alto estrés de roce capaz de generar cambios de fenotípicos en las células en el contacto directo con la fuerza de tensión. Para censar y transducir SS a vías intracelulares, los sistemas biológicos usan un juego específico de sensores, llamados mecano sensores. El proceso implica la conversión de la fuerza mecánica en una señal química o eléctrica. En cuanto a esto, el cilio primario es un organelo no móvil que emana de la superficie de célula de la mayor parte de tipos de célula de mamíferos que actúan como un mecano sensor. El cilio primario son los coordinadores claves de vías en el tejido homeostasis y, cuando está defectuoso puede causar enfermedades y desórdenes [3-4] (Figura 1).

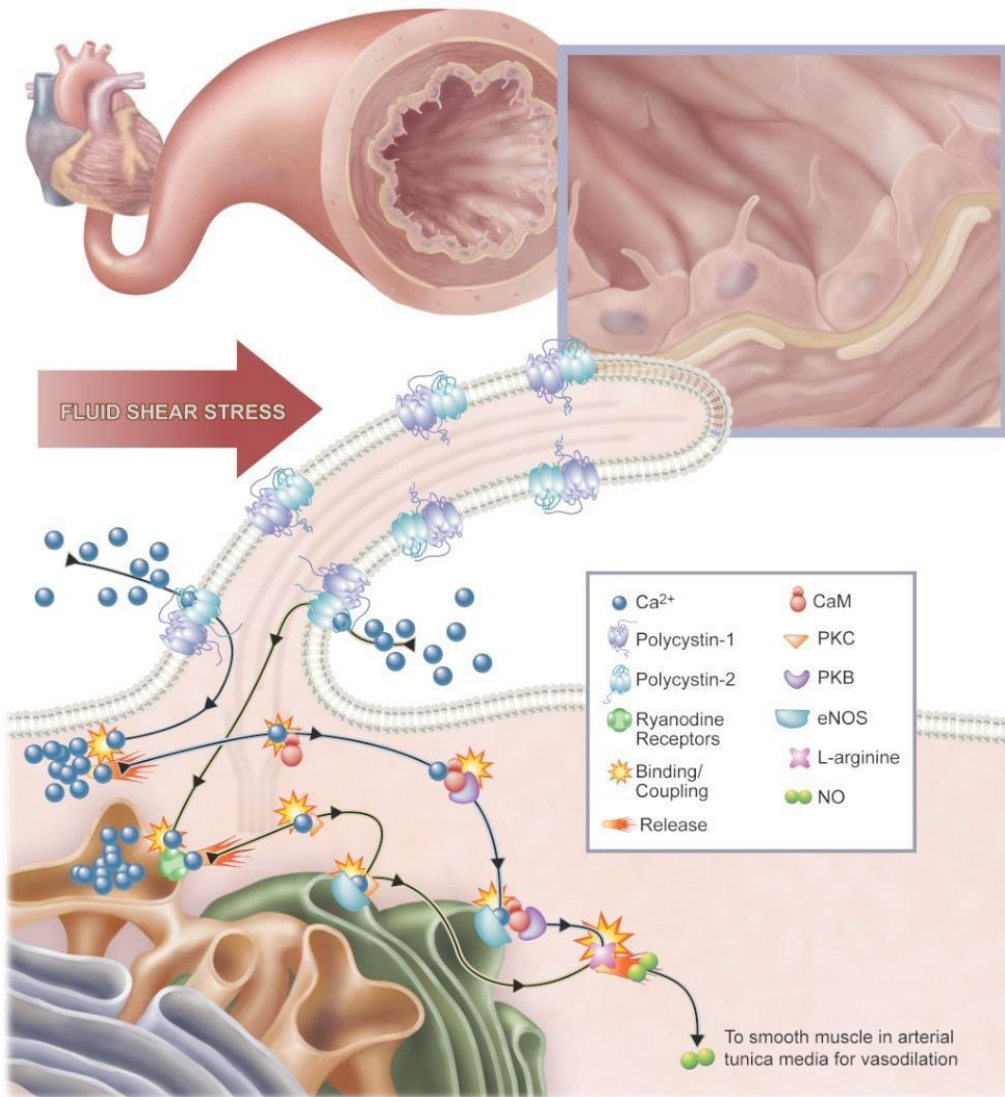


Figura 1: Estrés de Roce

## **Melanoma**

Es un tumor cutáneo maligno se origina en los melanocitos los cuales son las células responsables de la pigmentación de la piel. Los melanocitos se encuentran en la epidermis y producen un pigmento llamado melanina (Figura2 )

Las personas de piel clara tienen un mayor riesgo de padecer este tipo de cáncer de piel.

Las áreas cutáneas más comunes para que aparezca un melanoma son las que se encuentran más expuestas al sol como lo son: la cara, el cuello y la nuca, los brazos y las pantorrillas [1].



**Figura 2: Melanoma**

## **Angiogénesis tumoral**

Angiogénesis se define como la creación de nuevos vasos sanguíneos. Este proceso se considera normal en procesos como desarrollo de embrión, en los procesos de cicatrización y en el ciclo reproductor femenino.

La angiogénesis juega un papel fundamental en el crecimiento del melanoma y metástasis. Incluso con algunos de los inductores proangiogénicos más importantes conocidos, hay una falta de conocimiento sobre el papel de las fuerzas hemodinámicas en la angiogénesis tumoral.

El proceso de angiogénesis es crucial para la progresión y la metástasis de la mayoría de tumores sólidos incluyendo melanomas. La revisión corriente resume el conocimiento existente de los mecanismos de angiogénesis en el melanoma, así como la corriente antiangiogénica estrategias terapéuticas y sus objetivos. Enfocamos principalmente en el papel de los factores de crecimiento claves que son secretados por células de melanoma y sabido para provocar respuestas angiogénicas, y sus receptores expresado tanto sobre células de melanoma como sobre endotelial. Muchos de estos factores de crecimiento funcionan en la sinergia con receptores para la matriz extracelular, integrinas, y la matriz metaloproteinasas (MMPs). Todos estos sistemas de moléculas son activados durante las etapas principales de angiogénesis como la migración endotelial, la proliferación, y la reorganización de rodear la matriz extracelular. El bloqueo de estas moléculas y sus senderos río abajo conduce a la inhibición de melanoma vascularización. Así, estas clases de moléculas son esenciales para el melanoma angiogénesis y, por lo tanto, podrían servir como objetivos prometedores para la intervención terapéutica. Muchos compuestos recientemente desarrollados que apuntan senderos claves en angiogénesis están en sus etapas finales de ensayos clínicos [5].

## **Hipótesis**

Las fuerzas de estrés de roce activan un cambio de fenotipo del citoesqueleto en las células de melanoma

## **Objetivo General:**

Investigar si las fuerzas estrés de roce inducen cambios en las células de melanoma induciendo un fenotipo endotelial

## **Objetivos específicos:**

**Objetivo 1.-** Someter a las células de melanoma a estrés de roce de microvasculatura.

**Objetivo 2.-** Determinar el efecto del estrés de roce en el en la orientación respecto a la dirección de estrés de roce las células de melanoma

**Objetivo 3.-** Determinar el efecto del estrés de roce en la coherencia de las células de melanoma.

## **Materiales:**

- Vaselina
- Parafina
- Vaso precipitado
- Placas 10cm y 6cm para células

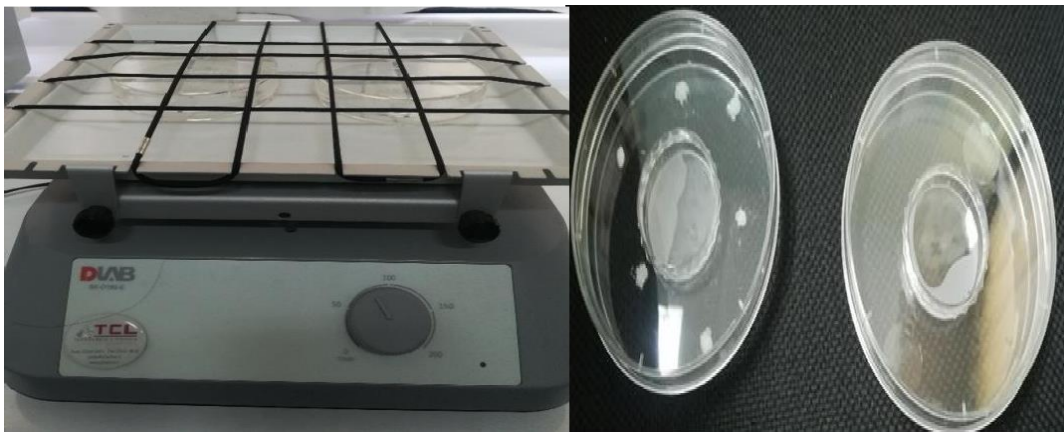
## **Métodos:**

### ***Cultivo células de melanoma***

La línea celular de melanocitos murinos B16F10 se cultivó (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) en medio RPMI-1640 (Gibco), se ajustó el pH a 7,2 y se suplementó con 10% de una mezcla que consiste en suero bovino fetal (SFB) y recién nacido (NCS) 1:1 como suplemento para estimular la división celular [6].

***Placas estrés de roce*** Se prepararon las placas para montar el ensayo de estrés de roce, donde la placa de 35mm se pegó en el centro de la placa de 100mm (Nest,

BIODEL), utilizando el pegamento Parafina vaselina 3:1, las placas se pusieron durante 15 min en una estufa para derretir el pegamento y que quedara sellado y adherido. A una de las placas se les agregó 6 pelotitas de mismo pegamento para simular el estrés de roce turbulento. Las placas se esterilizaron a la luz UV durante 15 min (Figura 3).



**Figura 3: montaje de placas para generar estrés de roce (SS) Turbulento (SS) Laminar**



### Montaje estrés de roce

Para el montaje del ensayo de estrés de roce se utilizaron dos condiciones diferentes, un flujo laminar y un flujo turbulento, más el respectivo control estático. Las células de melanoma B16F10 se sometieron a shear stress utilizando la metodología descrita por de la Paz *et al*, 2012. En resumen, previo al sembrado de las células, las placas que fueron modificadas como se describió anteriormente se recubrieron de gelatina al 0,1 %, durante 15 min. Las células de melanoma se sembraron en la periferia de placas de cultivo de 100. Las monocapas confluyente ~80% se privaron de sueros durante toda la noche, a continuación las placas se sometieron a estrés de roce orbital durante 24 horas (laminar y turbulento) (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) usando un agitador orbital (Dragón Lab, TCL) situado dentro de la incubadora. Debido a que las células están restringidas a la periferia en estas placas de cultivo modificadas el estrés de roce laminar (LSS) a través de la monocapa se aproxima como la tensión máxima de corte en la pared:  $\tau_{max} = a\sqrt{\rho\eta} (2\pi f)^3$ , donde  $a$  es el radio de rotación orbital (5,25 cm),  $\rho$  es la densidad del medio (1,0 g / mL),  $\eta$  es la viscosidad del medio ( $7,8 \times 10^{-3}$  dinas\*s / cm<sup>2</sup>) y  $f$  es la frecuencia de rotación (rotaciones / segundo). Usando esta ecuación, se sometieron las células a LSS de 0,5 N / m<sup>2</sup>, que está dentro del rango de LSS capilar fisiológico. Con el fin de observar cómo los cambios en LSS induce modificaciones en las células de melanoma se sometió a estrés de roce turbulento (TSS) mediante la adición de obstáculos físicos no uniformes. Finalmente, las células de melanoma del mismo pasaje, no sometidas a flujo (estáticas), se utilizaron como control. Las magnitudes y frecuencias utilizadas para estos experimentos se eligieron para ser coherente con los encontrados en la vasculatura [7] (Figura 4).

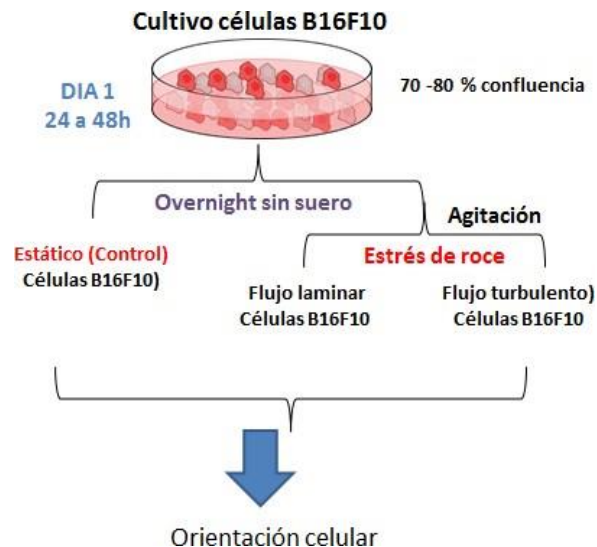


Figura 4: Explicación del montaje del ensayo de estrés de roce.

### ***Orientación celular***

Las células que fueron sometidas a estrés de roce laminar y turbulento más el control, fueron evaluadas con el programa Orientation J el cual permite caracterizar mediante imágenes la orientación de las células de melanoma en una región de interés. Finalmente se obtuvo la caracterización cuantitativa de la coherencia celular. Estos resultados fueron analizados por ANOVA de una vía seguido por un post test de tuckey para comparaciones entre los tratamientos. Para esto, una vez finalizado el ensayo estrés de roce se retiró el medio de cultivo condicionado, el cual fue guardado para análisis posteriores con la línea celular HUVEC. Las placas fueron lavadas 3 veces con PBS1X y se agregó 3 mL de medio de cultivo para proceder a fotografiar las células en un microscopio invertido, posteriormente las fotografías fueron analizadas en el programa orientation J. Este análisis se complementó con imágenes en microscopía de fluorescencia en donde las células fueron teñidas con DAPI para observar orientación de los núcleos.

### **Resultados y Discusión**

Se realizaron los ensayos de estrés de roce laminar y turbulento los datos se analizaron en el programa Image J donde se analizó la coherencia de la orientación de los núcleos. La figura 5 muestra un histograma de frecuencia de distribución de los datos de las células de melanoma sometidas a estrés de roce laminar, se observa que la mayoría de la frecuencia de datos se concentra entre los ángulos  $0^\circ$  y  $30^\circ$  la mayor frecuencia de los datos se acumula específicamente entre el rango de ángulos  $4^\circ$  y  $6^\circ$ . Los resultados arrojados en este análisis son los esperados debido a que el flujo laminar constante genera una orientación más coherente de las células.

En la figura 6 se analizaron los datos de las células sometidas a estrés de roce turbulento, de igual forma que en gráfico anterior. En este caso los resultados observados evidencian una distribución de datos más caótica en comparación a la célula sometida al estrés de roce laminar, la frecuencia de ángulos va de  $0^\circ$  a  $56^\circ$ , estos resultados eran esperados debido a que en este ensayo se encontraban obstáculos que impedían un flujo laminar constante, generando un flujo turbulento.

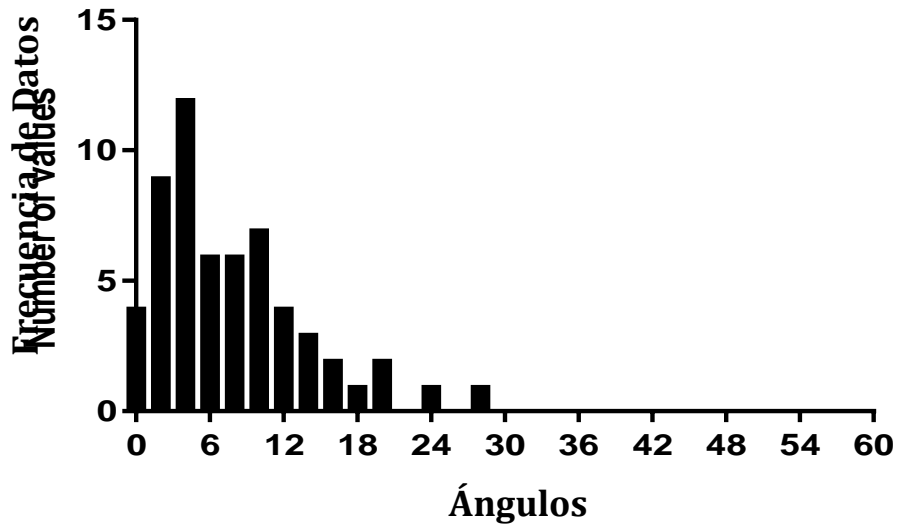


Figura 5: Histograma de frecuencia de distribución de datos en el flujo laminar.

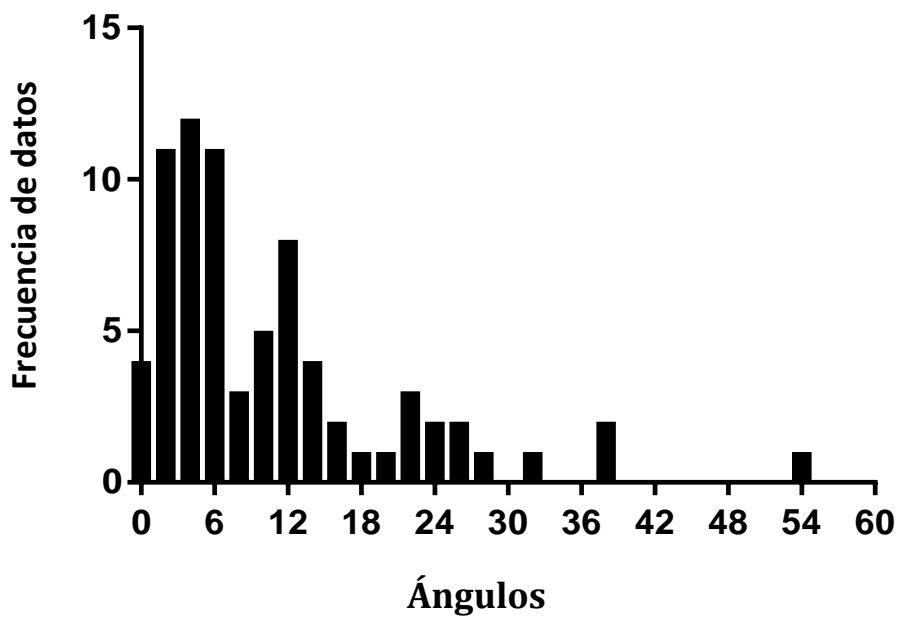


Figura 6: Histograma de frecuencia de distribución de datos en el flujo turbulento

Para comparar la orientación de las células sometidas a estrés de roce laminar y turbulento, se realizó un gráfico uniendo ambos resultados (Figura 7), los resultados observados evidencian la distribución de frecuencias diferentes entre ambos tratamientos, en donde el color rojo representa el estrés de roce turbulento y el color azul representa el estrés de roce laminar. Se observa claramente que el tratamiento turbulento muestra una mayor frecuencia de ángulos en comparación con el laminar.

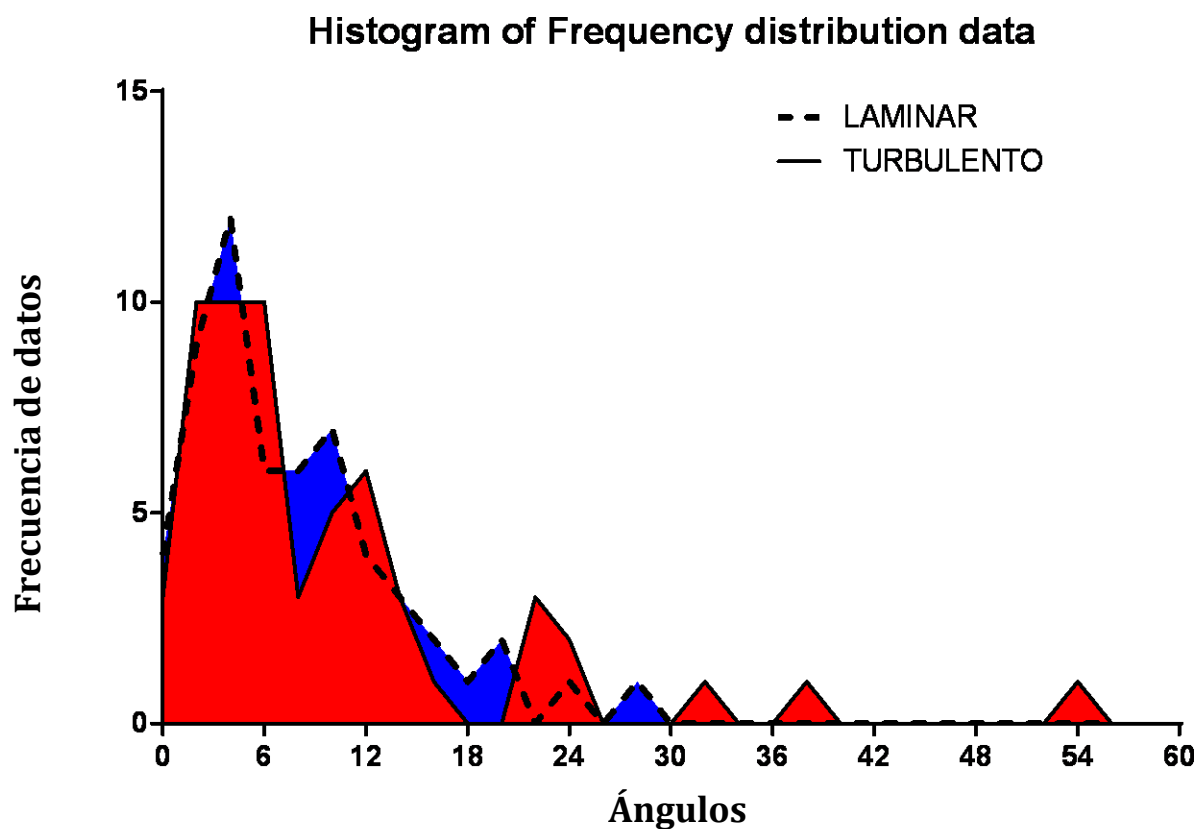


Figura 7: Histograma para la comparación de distribución de frecuencias de ambos tratamientos laminar y turbulento

En el gráfico de respuesta angular se puede observar la desviación estándar, promedio, máximo y el mínimo de los datos obtenidos en la investigación. Las variables analizadas fueron el estrés de roce en el flujo laminar, estrés de roce en flujo turbulento y en un medio control estático. Con esto se pudo verificar que existe una diferencia significativa entre el flujo laminar y el turbulento.

Al analizar las cajas del gráfico que representan la desviación estándar se observan claras diferencias entre el control estático que posee una desviación estándar mayor en comparación con los tratamientos laminar y turbulento, lo que es lógico ya que en este control no existía un flujo que limitara a las células a crecer en una sola orientación, en cambio, como era esperado, estas crecían sin coherencia a diferencia de los tratamientos laminar y turbulento que si estaban sometidas a flujo por estrés de roce lo que creo una coherencia en la orientación mayor evidenciado por la menor desviación de los ángulos. En el caso del tratamiento turbulento la desviación es un poco mayor que el tratamiento laminar lo que puede deberse a la presencia de obstáculos que desviaban el flujo creando una mayor distribución de ángulos

Al analizar los valores de ángulo máximo y mínimos representado por las barras en el gráfico, el valor máximo alcanzado por el flujo laminar fue de  $36^\circ$ , mientras que en el flujo turbulento fue de  $56^\circ$  y el del estático fue  $85^\circ$ .

Esto nos indica que los ángulos en el medio estático tienden a tener valores mayores ya que como se explicó anteriormente al no poseer un flujo constante las celular crecen desordenadas, mientras que las células que fueron sometidas a un estrés de roce de flujo laminar sus ángulos son menores debido a que el flujo presente aquí es constante y las células se limitan a crecer orientadas por este flujo, en tanto las células sometidas al flujo turbulento es constante al igual que el laminar, pero presenta pequeños obstáculos los cuales hacen que algunos ángulos celulares se desvíen del ángulo cero alcanzando un mayor grado angular, esto debido a que son muchas veces desviados por los obstáculos. (Figura 8)

Los análisis estadísticos realizados por t-student muestran diferencias estadísticamente significativas entre el control estático y ambos tratamiento, además un siguiente análisis indica que entre el tratamiento laminar y turbulento también existen diferencias significativas.

### Respuesta Angular

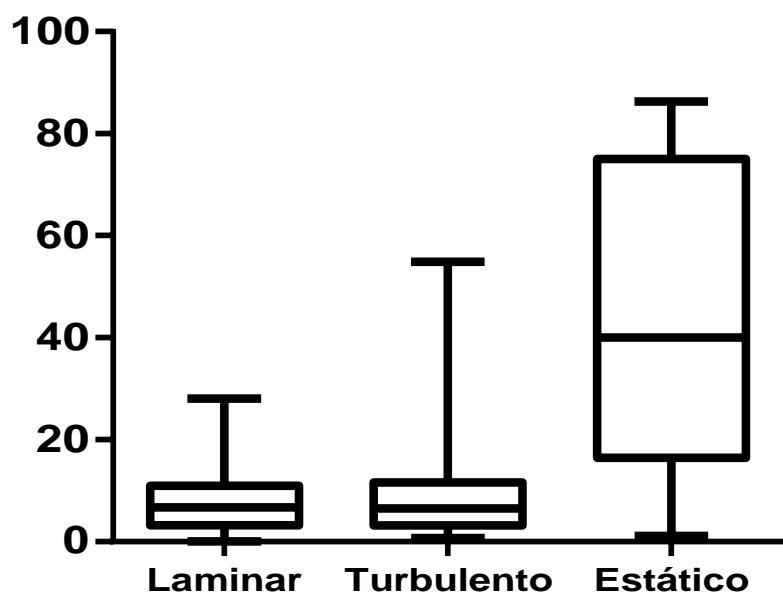


Figura 8: Box Plot de la respuesta angular de las células de melanomas sometidas a estrés de roce laminar, turbulento y control estático.

## Conclusiones

- Se logró montar un modelo de estrés de roce en células de melanoma B16F10. Mediante ecuaciones de dinámica de fluidos se obtuvo el cálculo para generar estrés de roce laminar y turbulento.
- Los resultados de estrés de roce en las células de melanoma mostraron diferencias de orientación entre las células sometidas a flujo laminar y turbulento, este último presentó mayor distribución de ángulos lo que implicó una menor coherencia en la orientación de los núcleos en comparación al tratamiento de células sometidas a flujo laminar las cuales evidenciaron mayor coherencia de orientación de núcleos.
- Los gráficos de Box plot mostraron las diferencias en las desviaciones estándares de los ángulos en ambos tratamientos versus el control estático, en donde se observó una mayor desviación en el tratamiento turbulento en comparación con el tratamiento de las células sometidas a flujo laminar, siendo estos estadísticamente diferentes entre ellos y además al comparar el control estático con los tratamientos también se observaron diferencias estadísticas.
- En base a la evidencia antes mencionada, se logra aceptar la hipótesis de que las fuerzas de estrés de roce activan un cambio de fenotipo del citoesqueleto en las células de melanoma.

## **Bibliografía**

### ***Introducción***

- 1.- Howe, H.L., et al., Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. J Natl Cancer Inst, 2001. 93(11): p. 824-42. Resumen
- 2.- Alonso, F., Epidemiology of cutaneous melanoma in Chile. Revista Médica Clínica Las Condes, 2011. 22(4): p. 6. Resumen
- 3.- Galie, P.A., et al., Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(22): p. 7968-73.
- 4.- Vaupel, P.W. and D.K. Kelleher, Pathophysiological and vascular characteristics of tumours and their importance for hyperthermia: heterogeneity is the key issue. Int J Hyperthermia, 2010. 26(3): p. 211-23.
- 5.- Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.

### ***Metodología***

- 6.- 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
- 7.- 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.