



Universidad del Bío Bío
Facultad de Ciencias Básicas
Chillán

Efecto de la ausencia de $A_{2A}AR$ en la angiogénesis del melanoma humano

Integrantes: Catherine Polanco
Claudio Vidal

Docente: Andrés Rodríguez

Fecha: 27/12/2016

Universidad del Bío Bío
Facultad de Ciencias Básicas
Chillán



Introducción

El melanoma es el menos común pero el más peligroso de todos los tipos de cáncer de piel, cuando el melanoma pasa a fase metástasis este es casi siempre fatal. Los factores de riesgo para el melanoma incluyen factores genéticos y ambientales (debido a que la piel funciona como barrera para el cuerpo y está expuesta a diferentes agentes contaminantes).

La angiogénesis es un factor clave en el crecimiento tumoral, este es un proceso dinámico y caótico y esta se evalúa mediante la expresión de marcadores endoteliales o de proteínas pro-angiogénicas en la microvasculatura. La hipervascularización tumoral está relacionada con metástasis tumoral. La vascularización del melanoma es esencial para la demanda de nutrientes y oxígeno que necesita el tumor maligno para crecer, invadir y generar metástasis.

La adenosina extracelular es una biomolécula inmunomoduladora y regulador homeostático producida por la hidrólisis de ATP por acción de apirasa y 5'-nucleotidasa. El nucleósido de purina actúa como modelador vascular asociado a efectos citoprotectores. Estos efectos se caracterizaron en 5 grupos: anti- y pro inflamatorias, incremento en la demanda de oxígeno, protección contra daño isquémico y la estimulación de angiogénesis.

La adenosina ejerce su efecto a través de una familia de receptores acoplados a proteína G conocido como: A₁AR, A_{2A}AR, A_{2B}AR Y A₃AR, estas están asociadas en las células endoteliales, células responsables del inicio del proceso de angiogénesis (varían los niveles según el tipo de vaso). La fisiopatología del A_{2A}AR no ha sido completamente estudiada, debido a que necesita un gran concentración de agonista, además posee una elevada expresión en inflamación, daño tisular y enfermedades, aunque exista información de A_{2A}AR hay una falta de conocimiento de este acerca del rol en la angiogénesis tumoral.

Como investigación se nos planteó cuál era el efecto de la ausencia de A_{2A}AR en la angiogénesis del melanoma humano.

Universidad del Bío Bío
Facultad de Ciencias Básicas
Chillán



Objetivos 1

- Medir el flujo sanguíneo en el área peritumoral (Medido por lasser doppler)
- Medir el flujo sanguíneo en el área peritumoral cuando esta fue estimulada por una inyección de La vasodilatación fue estimulada por una inyección de acetilcolina.
- Retirar, fijar y guardar tumores para luego ser enviados para cortes histológicos.

Objetivo específicos 1

- Efecto de la ausencia de $A_{2a}AR$ en la angiogénesis del melanoma humano

Objetivos 2

- Analizar los vídeos para ser enviados a estadística para aplicar el método t y anova.

Objetivos específicos 2

- Analizar el efecto de la ausencia del receptor $A_{2a}AR$ en la angiogénesis del melanoma humano

Universidad del Bío Bío
Facultad de Ciencias Básicas
Chillán



Procedimiento

- El día 3 de junio del 2016 se empezó a realizar mediciones de las células de melanoma murino (B16F10) en los dos tipos de ratones inyectados (ratones salvajes WT los ratones Knockout KO).
- Se prendieron los equipos (laser doppler perimed, placa que mantiene a los ratones a 25°C, computador) se buscó todos los elementos necesarios para el buen desarrollo del procedimiento (anestesia Ketamina/xilacina 100/10 mg/kg anestesia quirúrgica Duración de la anestesia 20-30 minutos, alcohol, bisturíes, fijador, acetilcolina y jeringas)
- se procedió a ir a buscar a los ratones al container para ser llevados luego al laboratorio.
- Se revisaron los ratones (tamaño de su tumor, para poder analizar el flujo sanguíneo con el laser doppler perimed) se extrajeron dos ratones de cada tipo (WT- KO).
- Una vez escogidos se procedió a depilarlos en la parte del abdomen para que al colocarlos en la medición de su flujo este no interviniera.
- Son llevados a laboratorio.
- Una vez escogidos los ratones se procede a anestesiarse en el abdomen (intraperitoneal), los ratones eran tomados fuertemente de la parte de atrás del cuello y la cola se envolvía en el dedo meñique para inmovilizar al ratón, para que al ser pinchado este no se moviese.
- Cuando la anestesia empieza hacer efecto los ratones empiezan a tambalear luego son llevados a la plancha para mantener su temperatura corporal.
- Se toma uno de ellos y se coloca boca arriba, hay que colocar cinta adhesiva en su patas delanteras y la cola (se humedecen los ojos con una toalla húmeda porque al anestesiarse estos no los cierran).
- Una vez fijado el ratón se procede a medir con el laser doppler perimed, se fija aparte del brazo del equipo a una distancia correspondiente para empezar a medir el área del tumor.
- Se ingresa al programa, se procede a ingresar el usuario, la fecha y cual tipo de ratón (KO-WT).
- Luego se procede a grabar durante un minuto y medio el área del tumor, luego de pasado ese tiempo se procede a pinchar intraperitoneal con acetilcolina en el área cercana al tumor y se procede automáticamente a grabar durante otro minuto más (para ver la cómo se estimula la vasodilatación)
- Durante la grabación hay que fijarse en los picks de diferencia antes y después de ser inyectados con la acetilcolina.
- Luego este procedimiento se realiza con los otros tres ratones.
- Luego se espera que los ratones despierten de la anestesia. Uno de los ratones no resistió la anestesia en este caso no se procedió a sacar el tumor.
- Luego los ratones son colocados en sus respectivas jaulas.

Universidad del Bío Bío
Facultad de Ciencias Básicas
Chillán



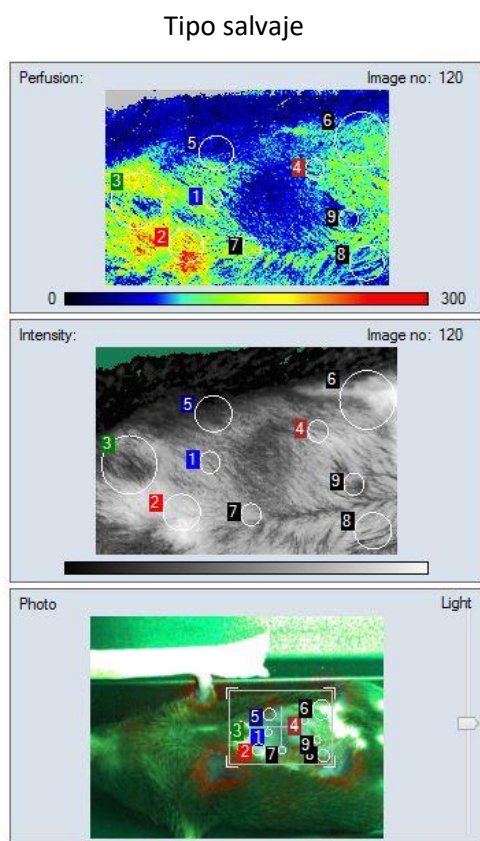
- Se procede a limpiar y dejar todos los equipos apagados.
- **Estos procedimientos se repitieron varias veces en diferentes fechas.**
- Cuando los ratones presentaban un tumor muy notorio, se procedía a medir, para después extraer el tumor. En el mayor de los casos los ratones no resisten a la anestesia o eran sacrificados.
- Luego se procedía a extraer la parte del tumor con un trozo de piel, se hacía un mínimo corte en su abdomen (con mucho cuidado para no romper el peritoneo).
- Se procedía a retirar el tumor con mucho cuidado con un trozo de piel, se trataba de extraer la mayor cantidad de tumores. Luego era fijado en un pedazo de cartón con corchetes y luego son agregados en un medio fijador (etiquetado con el tipo de ratón y la fecha) para que después ser enviados al laboratorio para hacer cortes histológicos.
- Así terminado con la experimentación el día 02-agosto-2016.

Universidad del Bío Bío
 Facultad de Ciencias Básicas
 Chillán

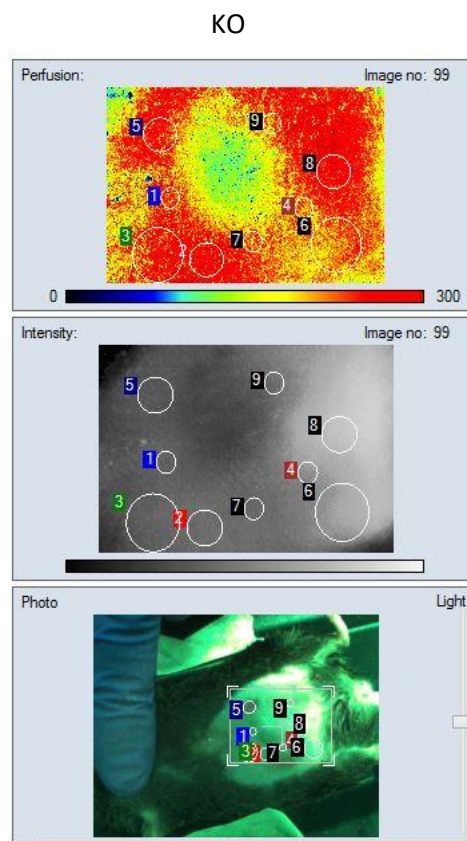


Resultados

- Se pudo observar un mayor crecimiento tumoral en centímetros de melanoma B16F10 en los ratones KO frente al tipo salvaje.
- Los ratones tipo salvaje tuvieron una vida más larga que los ratones KO.
- Al analizar 9 áreas alrededor del tumor de todos los ratones, las capturas en el programa PIMsoft muestran un mayor flujo sanguíneo y vasodilatación en el melanoma desarrollado en los ratones KO, comparado con los tipo salvaje el cual se puede observar en la siguiente captura:



+Ach

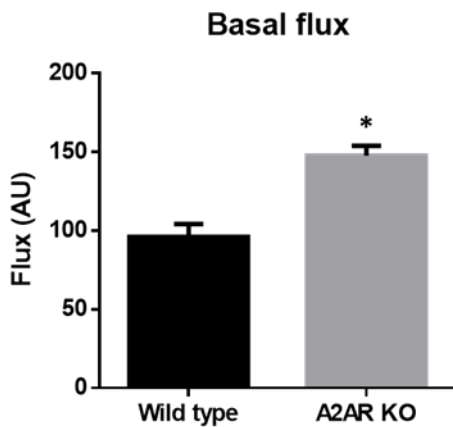
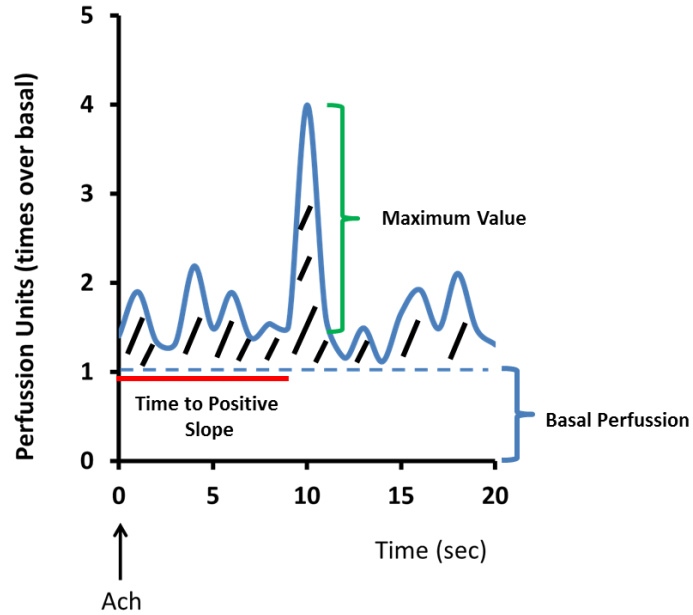


+Ach

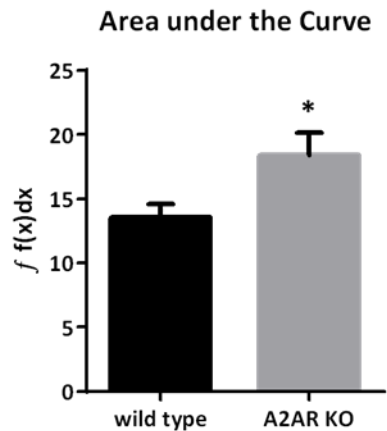
Universidad del Bío Bío
 Facultad de Ciencias Básicas
 Chillán



Parámetros analizados por estudios forma de curva



Basal Flux. * $p < 0.001$ vs wild type. Statistical analysis was performed using paired T test

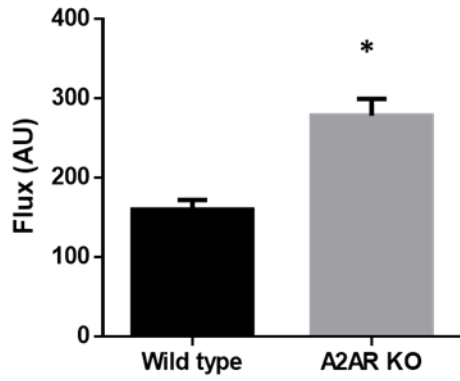


Area under the curve from perfusion curves. * $p < 0.05$ vs wild type. Statistical analysis was performed using paired T test

Universidad del Bío Bío
Facultad de Ciencias Básicas
Chillán

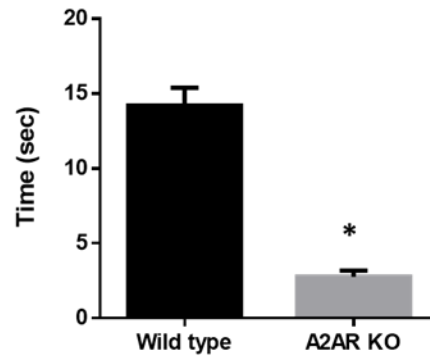


Maximum Perfusion Value

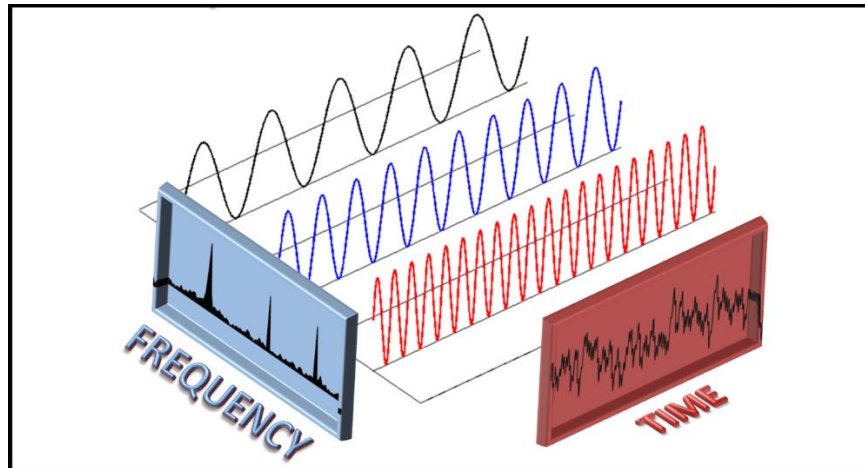


Maximum Perfusion Value. * $p < 0.001$ vs wild type. Statistical analysis was performed using paired T test

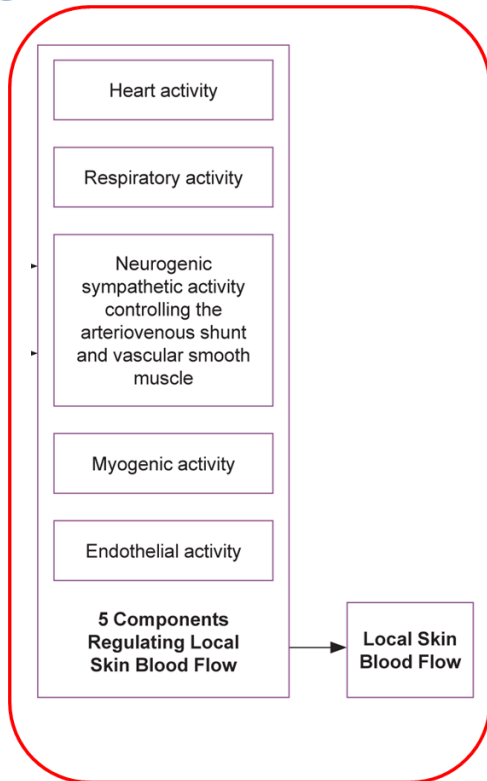
Positive Slope



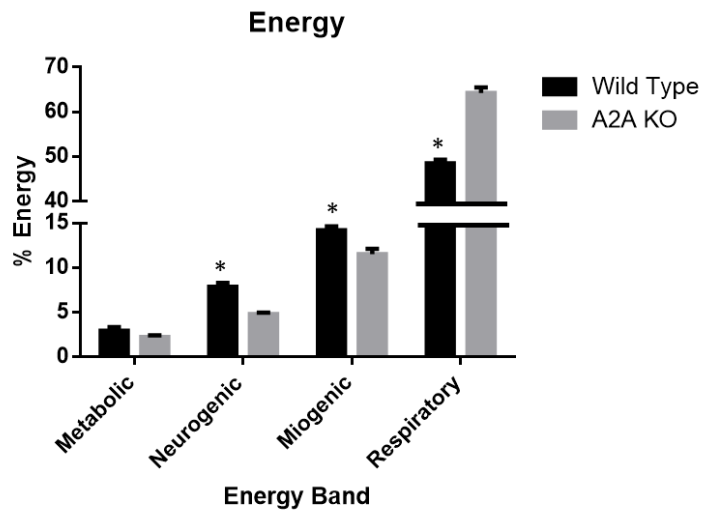
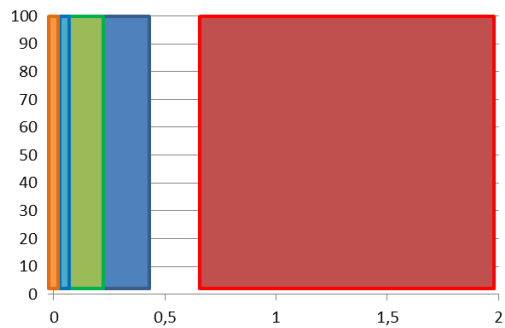
Slope Value higher than basal. * $p < 0.001$ vs wild type. Statistical analysis was performed using paired T test



Universidad del Bío Bío
 Facultad de Ciencias Básicas
 Chillán



- Banda Metabólica: 0.0095-0.016 Hz
- Banda Neurogénica 0.02-0.06 Hz
- Banda Miogénica: 0.06-0.15Hz
- Banda Respiratoria: 0.15- 0.4 Hz
- Banda Cardíaca : 0.6-2 Hz



Universidad del Bío Bío
Facultad de Ciencias Básicas
Chillán



- Los ratones con deficiencia en receptor A2 de adenosina presentan con respecto a los ratones silvestres: un mayor flujo sanguíneo basal, una mayor inducción de vasodilatación en respuesta a acetilcolina y una mayor área de perfusión.
- El análisis por transformada de Fourier demostró que los ratones deficientes en receptor A2 de adenosina presentan una menor banda energética para componentes neurogénico y miogénico y una mayor banda respiratoria que el ratón silvestre.
- En conclusión, el ratón deficiente en receptor A2 de adenosina, podría presentar un proceso de neovascularización tumoral mucho más desarrollado que el ratón silvestre, con deficiencias en el control nervioso y metabólico de los vasos sanguíneos, lo cual podría deberse a una disfunción endotelial o a la generación de vaso sanguíneo con células tumorales como lo observando de vasculogénesis y mimetismo vascular.

Conclusiones

- Estos hallazgos podrían ser beneficios para estudios pre-clínicos de melanoma en humanos, identificando modelos capaces de describir los fundamentos y características del flujo sanguíneo con el objetivo de medir de modo inocuo el posible efecto de futuras terapias anticancer.