



Universidad del Bío-Bío

Facultad de Ciencias

Departamento de Ciencias Básicas

Medio condicionado de células de melanoma sometida a estrés de roce patológico modifican mecanismos angiogénicos endoteliales

Título pre-pandemia

Medio condicionado de células de melanoma sometida a estrés de roce patológico estimulan la vía angiopoyetina-2/Tie2 modificando mecanismos angiogénicos endoteliales

Iván Molina Márquez

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológica

Profesor Guía: Dr. Andrés Rodríguez Morales

Chillán 2020



Universidad del Bío-Bío

Facultad de Ciencias

Departamento de Ciencias Básicas

**Medio condicionado de células de melanoma sometida a estrés
de roce patológico modifican mecanismos angiogénicos
endoteliales**

Título pre-Pandemia

Medio condicionado de células de melanoma sometida a estrés de
roce patológico estimulan la vía angiopoyetina-2/Tie2 modificando
mecanismos angiogénicos endoteliales

Iván Molina Márquez

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológica

Profesor Guía: Dr. Andrés Rodríguez Morales

Chillán 2020

Índice	Página
Agradecimientos.....	1
Resumen.....	2
Introducción.....	4 -23
Hipótesis y objetivos.....	24 - 25
Materiales y métodos.....	26 - 30
Resultados.....	31 - 50
Discusión y Conclusión.....	51 – 61
Proyecciones.....	62
Referencias.....	63- 73

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Bío- Bío, al programa de posgrado y departamento de ciencias básicas por el apoyo otorgado durante esta mi etapa de formación.

Al Dr. Enrique Werner, director del programa del magíster en Ciencias Biológicas, por su apoyo constante e igualmente a la Dra Marcel Vidal ex directora del programa agradecer por su empatía y por su confianza al momento de ingresar al programa de estudio.

Dr. Andrés Rodríguez, jefe del laboratorio de Comunicación Celular y Dinámica Vascular (CCDV), por su guía en cuanto al desarrollo de esta investigación.

A los miembros del laboratorio de Fisiología vascular especialmente al Dr. Carlos Escudero jefe del laboratorio, quien nos facilitó material e infraestructura en técnicas necesarias para llevar a cabo los experimentos de esta investigación, de igual manera a la Msc. Jesenia Acurio y Felipe Troncoso por asesorarme en técnicas específica y constante apoyo.

Al financiamiento brindado por las becas interna de la universidad (beca docente e investigación) para financiar mi estadía y mi proyecto de tesis.

Al laboratorio de CCDV y a Catalina Muñoz por su ayuda incondicional en la realización de experimentos y aportes en esta tesis.

A Dios por abrir todas las puertas y colocar personas idóneas para culminar esta etapa y a mi familia especialmente a mi esposa por sus apoyo incondicional y paciencia.

Resumen

Las células presentes en los vasos sanguíneos son capaces de responder a un sinnúmero de estímulos tanto físicos como químicos. Dentro de los estímulos físicos, destacan los estímulos mecánicos generados por el flujo sanguíneo, como el estrés de roce. En general existen dos tipos de estrés de roce: laminar o fisiológico y turbulento o patológico. Pacientes con patologías vasculares crónicas poseen una tendencia a presentar mayores niveles de flujo turbulento, debido a una estructura vascular deficiente. Coincidentemente, se ha observado que paciente con patologías vasculares crónicas poseen un peor manejo del crecimiento tumoral y metástasis. Dicho crecimiento se explica en parte mediante la liberación desde el tumor, de moduladores biológicos que promueven un desarrollo vascular deficiente, angiogénesis patológica, en el microambiente celular que rodea al tumor. Actualmente, se desconoce si la liberación de moduladores biológicos angiogénicos, puede ser estimulado por el efecto de estrés de roce patológico (turbulento) sobre las células tumorales. Ya que el estrés de roce es capaz de modificar el fenotipo de distintas células vasculares, creemos que el estrés de roce patológico influye en la liberación de mediadores celulares desde el tumor provocando una angiogénesis patológica en el microambiente tumoral. Para responder esta pregunta, en esta investigación se evaluó el efecto de medio condicionado derivado de células de melanoma sometidas a estrés de roce fisiológico y patológico en la proliferación, angiogénesis y migración endotelial. Los análisis se realizaron con el programa estadístico IBM SPSS v. 23 para Window. Se consideró * Significativo $p \leq 0,05$. Los resultados arrojaron que las células de melanoma son sensibles al estrés de roce diferencial y el medio condicionado derivado de células tumorales sometidos por flujo patológico (turbulento) generaron una disminución en la proliferación, un aumento en la migración ($p \leq 0,05$) y una mayor formación de tubos en células endoteliales vasculares con respecto al medio condicionado derivado del estímulo con flujo fisiológico (laminar) y el control estático ($p \leq 0,05$).

Esta investigación nos permite conocer efectos fisiológicos *in vitro* para tener un acercamiento a lo que ocurre en patologías vasculares y cáncer de melanoma por lo que a futuro se pueden evaluar vías de señalización que estén implicadas en estos efectos y de esta manera profundizar el comportamiento celular.

Palabras claves: Células endoteliales, Melanoma, Estrés de roce, Angiogénesis

Nota: *En la Tesis original debido a que conocíamos que un agente angiogénico en particular, Angiopoyetina 2 (Ang 2), aumentaba su liberación en flujo turbulento, se iba a estudiar su vía transducción mediante la inhibición del receptor Tie2, como responsable de los cambios fenotípicos observados en las células endoteliales. Si bien esto no pudo desarrollarse por las restricciones de Pandemia, dejamos parte del estado del Arte sobre la vía Ang 2-Tie 2 en el presente documento.*

DESCRIPCION PROPUESTA

El objetivo original de esta investigación era: Determinar si medio condicionado derivado de células de melanoma sometido por estrés de roce patológico, produce a una señalización angiogénica alterada en células endoteliales, vía inhibición receptor Tie2

Objetivo por Pandemia: Determinar si medio condicionado derivado de células de melanoma sometido por estrés de roce patológico, produce a una señalización angiogénica alterada en células endoteliales, respecto a medio condicionado derivado de flujo laminar y condición estática.

INTRODUCCIÓN

Sistema Vascular y Hemodinámica

El aparato circulatorio o sistema vascular está conformado de vasos que transportan linfa y sangre a través del organismo. El líquido linfático es un líquido claro, incoloro que contiene agua y leucocitos. El sistema linfático ayuda a proteger al cuerpo de infecciones y a mantener los líquidos corporales en equilibrio mediante el filtrado y drenaje de la linfa en todas las partes del cuerpo. (Hahn & Schwartz, 2009). Por otro lado, la sangre que circula por este sistema puede hacerlo hacia los pulmones, denominada circulación menor y sistémica, vale decir a todos los tejidos del cuerpo o también llamada circulación mayor ambos integrados por el corazón. La sangre es impulsada a través de grandes vasos sanguíneos como las arterias y las venas que se ramifican en vasos sanguíneos cada vez de menor tamaño con el propósito de liberar oxígeno y nutrientes a todos los tejidos y elimina los desechos de los mismos. (Lima et al., 2009).

Con respecto a los vasos sanguíneos, estos pueden dividirse a nivel macro en:

Arterias: Vasos sanguíneos que transportan sangre oxigenada desde el corazón hacia el resto del cuerpo.

Venas: Vasos sanguíneos que transportan sangre del cuerpo de regreso al corazón.

Capilares: Vasos sanguíneos diminutos que se encuentran entre las arterias y las venas que distribuyen sangre rica en oxígeno por el cuerpo (dela Paz & D'Amore, 2009).

En relación a su estructura los vasos sanguíneos están compuestos por tres capas celulares. Una **capa externa o adventicia**, la que se caracteriza por una mayor resistencia contra la distensión, ésta capa formada por fibroblastos, fibra de colágeno del tipo I y fibras elásticas. Los vasos sanguíneos también poseen una **capa media o vascular**, la cual está formada por células musculares lisas, fibras de colágeno del tipo III y proteoglicanos y una **capa interna o íntima**, formada por células endoteliales que están en contacto directo con el flujo sanguíneo (Fig.1) (Mazurek et al., 2017). Estas células endoteliales poseen una variedad de receptores que detectan señales químicas (quimiorreceptores) y físicas (mecanorreceptores) desde el flujo sanguíneo, produciendo en ella cambios fenotípicos y funcionales (Loh et al., 2018) .

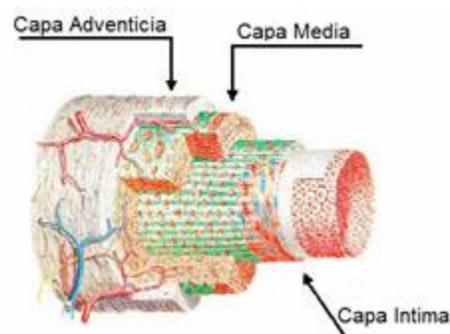


Figura 1. Capas de los vasos sanguíneos. (Diana Otero-Martínez, Luis-L. Otero-Pereiro y Vladimir González-Fernandez, 2014).

La sangre se rige bajo leyes hemodinámicas, en condiciones fisiológicas el flujo sanguíneo es mayoritariamente laminar, vale decir es un flujo ordenado y a una velocidad baja que genera un ruido despreciable o silente. El flujo laminar juega un papel ateroprotector en la inhibición de la trombosis, la adhesión plaquetaria, el reclutamiento de monocitos y la inhibición de la apoptosis de las células endoteliales (Gimbrone et al., 2000). Sin embargo, cuando aumenta la velocidad media, el diámetro del vaso sanguíneo, aumenta la densidad, pero disminuye la viscosidad de la sangre, se generan alteraciones en el flujo laminar produciendo turbulencias (fig.2). El flujo turbulento fluye en todas direcciones generando remolinos que en el tiempo altera el fenotipo endotelial, produciendo disfunción en esta monocapa y de igual manera en la angiogénesis generando vasos sanguíneos tortuosos, malformados no funcionales.

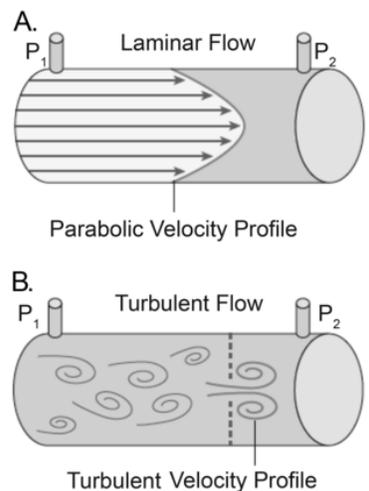


Figura 2. A) Representa un Flujo Laminar, es decir un Fluido Ordenado. Mientras tanto **B)** Es un Flujo Turbulento, Vale decir un Fluido Caótico. Esta imagen está modificada de (Kaminsky, 2012)

Flujo turbulento

Es importante señalar que el flujo turbulento en ciertas partes de los vasos sanguíneos y órganos como el corazón se produce indistintamente del estado de salud de las personas como por ejemplo en la aorta ascendente, arteria pulmonar, en válvulas cardiacas, bifurcaciones de vasos sanguíneos, detectándose en evaluaciones ecográficas altas ondas sonoras en el flujo de la sangre (Ciancaglini, 2004).

Para evaluar el flujo sanguíneo *in vivo* se puede utilizar modelos ecográficos doppler. En nuestro caso utilizamos la técnica Speckle la cual mide el retardo del tiempo en que la luz se refleja en un objeto en movimiento donde la luz observada debe ser diferente a la frecuencia emitida. Esta técnica permite ser cuantificable mediante la relación inversa entre el tiempo de decorrelación (τ_c) y la velocidad del flujo sanguíneo (V), es decir $1 / \tau_c = \alpha V$. Donde resultados muy distantes entre los valores mínimos y máximos se atribuye a flujo patológico. Por esta razón esta técnica es ampliamente utilizada para observar patologías cardiovasculares donde se pueden planificar terapias y seguimientos constantes en el paciente, ya que permite medir velocidad de la sangre y determinar si el flujo es fisiológico o patológico mediante la utilización del número de Reynolds (Giles, 1999; Montorfano et al., 2017).

El número de Reynolds es un número adimensional que permite predecir el carácter del flujo: Laminar (fisiológico) o turbulento (patológico). Este número es la relación de las fuerzas de inercia y fuerzas viscosas. Las fuerzas de inercia son: ρ es la densidad, V es la velocidad, D es el diámetro del cilindro y la fuerza de viscosidad de la sangre está determinada por μ en la siguiente ecuación: $Re = \rho V D / \mu$ (Kaminsky, 2012).

A continuación se indicará el número de Reynolds por el diámetro de vasos sanguíneos (tabla 1)

Tabla 1. Número de Reynolds que limita el flujo laminar y turbulento dependiendo del tamaño del vaso sanguíneo

VASO SANGUÍNEO	NUMERO DE REYNOLDS
Aorta Ascendente	1750
Aorta Descendente	1500
3 mm	375
2 mm	150
1 mm	50

mm= Milímetro

Cuando los parámetros del número de Reynolds superan el límite indicado en las tablas el flujo pasa a ser un flujo turbulento y comienzan a desarrollarse anomalías en las células presentes en el lumen vascular.

Flujo Turbulento y patologías Vasculares

El flujo turbulento está asociado con el empeoramiento de patologías vasculares, debido a que genera alteraciones en la capa interna de los vasos sanguíneos, lo que provoca cambios en el fenotipo del vaso, mediante un aumento de señales pro-inflamatorias, lo que conlleva a una baja producción de óxido nítrico y aumento las propiedades pro-adhesivas, pro-coagulantes y pro-proliferativas generando una función endotelial deteriorada (Chistiakov et al., 2017). A continuación, mencionaremos algunas patologías asociadas al flujo turbulento

Trombosis: Se define como la formación de un coágulo in situ. La trombosis comprende la adherencia y agregación plaquetaria, elementos del sistema inmune

como monocitos-macrófagos generando alteración en el flujo sanguíneos y en las células endoteliales.

Embolia: La embolia se define como la obstrucción parcial o total de un lecho capilar el cual genera daño endotelial y patología en la sangre.

Arterioesclerosis: Ocurre cuando placa se acumula dentro de las arterias provocando su endurecimiento Esta enfermedad afecta a las arterias mayores y medianas con lesiones que se hacen a medida que disminuye el calibre arterial.

Diabetes: La diabetes es una enfermedad en la que los niveles de glucosa de la sangre están muy altos. El exceso de glucosa en la sangre provoca el endurecimiento de las arterias arterosclerosis, lo que puede provocar ataques cardiacos, accidentes cerebro vasculares y/o mala circulación en los pies (Gu et al., 2017; Liang et al., 2005).

Para finalizar señalar que en toda patología vascular crónica se presentan zonas de flujo turbulento, el cual conlleva a una retroalimentación negativa crónica al mismo sistema vascular. A medida que esta condición empeora, el sistema vascular se hace más sensible a otras patologías, incluyendo cáncer maligno.

Cáncer

El cáncer se define como las enfermedades que ocurren en las células anormales que se caracterizan por multiplicarse de forma incontrolada, alternado y aumentando el volumen de los tejidos generando un tumor. Es importante señalar que los tumores benignos no son considerados un cáncer, ya que solo crecen en un determinada parte del cuerpo a diferencia del tumor maligno que si es canceroso, debido a que estas células se diseminan o generalmente el utilizado el término de metástasis de las células cancerosas que ocurre desde el tumor primario hasta órganos distantes (Sarkar et al., 2013).

Metástasis

Para completar la cascada metastásica, las células cancerosas deben desprenderse del tumor primario, penetrar en los sistemas circulatorio y linfático, evadir el ataque inmunológico, extravasar en lechos capilares e invadir y proliferar en órganos distantes. Para que el tumor pueda crecer e invadir nuevos tejidos requiere de la suministración de oxígeno y nutrientes provenientes de nuevos vasos sanguíneos o también llamada angiogénesis tumoral. Un tipo de cáncer metastático a la piel es el cáncer de melanoma (Gallo et al., 2017)..

Cáncer a la piel

El cáncer a la piel es la neoplasia más común en la última década a nivel mundial. Existen tres tipos de cáncer a la piel los cuales se dividen en cáncer de “piel no melanoma” y cáncer a la piel de melanoma (Dinnes et al., 2018).

La piel es definida como un órgano siendo el órgano más grande de nuestro cuerpo humano. Este órgano es compuesto por tres capas; hipodermis, tejido celular subcutáneo, la dermis, capa media de la piel y finalmente la epidermis siendo esta la capa más externa del órgano. Esta membrana (epidermis) se considera una barrera epitelial cuya función es proteger el cuerpo como por ejemplo de la deshidratación, las temperaturas extremas, patógenos químicos y biológicos. Dentro de los cánceres de “piel no melanoma” se encuentran el carcinoma basocelular (CBC) y el carcinoma espinocelular (CEC). Estos dos tipos de cáncer son los más agresivos con un 80% de muertos. EL CBC es el cáncer a la piel más común, afectando a hombres mayoritariamente que a mujeres, si bien el CBC es un cáncer poco metastásico es altamente invasivo y destructivo localmente originándose principalmente en las partes anatómicas de la cabeza y cuello de los seres humanos. Este tipo de cáncer se originan principalmente por la radiación ultravioleta (UVR), la cual puede dañar y alterar el DNA en las células de la piel modificando algunos genes como por ejemplo la mutación en el oncogén *BRAF* (Sample y He, 2018) y mutación en el gen P53, al igual que el CEC y el de melanoma.

El CEC es la segunda neoplasia maligna más común dentro de la piel; sin embargo, tiene una mayor tasa de mortalidad que CBC. Este carcinoma deriva de la proliferación de los queratinocitos, células más abundantes de la epidermis (80-90%). Este carcinoma puede generar metástasis a ganglios regionales u órganos como el cáncer de melanoma (Castañeda Gameros & Eljure Téllez, 2016).

Cáncer de melanoma

El melanoma es un tipo de cáncer de piel que se genera en la epidermis (Neifeld, 1996). Esta capa se compone de células llamadas melanocitos. Los melanocitos son células dendríticas derivadas de la cresta neural y son las células encargadas de producir la melanina. La melanina es un pigmento, proveniente de aminoácido tirosina, que se halla en la mayor parte de los seres vivos, siendo la melanina la encargada de dar el pigmento a la piel y cabellos. La principal función de la melanina es proteger a la piel de la UVR (Trotter et al., 2013). Sin embargo, cuando existe una alta exposición a la luz solar, los melanocitos son incapaces de proteger nuestro cuerpo por lo que comienza a existir un crecimiento descontrolado por parte de estos, originándose así el cáncer de melanoma.

Este cáncer es una causa importante de muerte, representa aproximadamente el 1% de todos los tumores malignos de la piel, además de ser la tercera neoplasia maligna cutánea más frecuente (Apalla et al., 2017). Según datos epidemiológicos se ha duplicado en la última década y cada año se diagnostican 132.000 nuevos casos de melanoma y 50.000 muertes relacionadas con este cáncer en todo el mundo, sin embargo las tasas de mortalidad varían según el país, el género y el origen étnico (Casariego y Baudo, 2004).

A pesar de causar el 3% del total de las neoplasias malignas de la piel, es responsable del 75% de las muertes relacionadas con ellas; su alta letalidad se relaciona con que suele diagnosticarse en etapas avanzadas y tiene una baja respuesta a tratamientos sistémicos, debido a que como todos los tumores forman su microambiente, el cual está compuesto por células inmune, además de ser

colaborados por el sistema vascular generándose el concepto de angiogénesis tumoral.

Angiogénesis y angiogénesis tumoral

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. Es un proceso fisiológico durante el desarrollo embrionario, cicatrización de heridas y reproducción celular (Muz et al., 2015). En la tumorogénesis, se han identificado múltiples factores estimulantes de la angiogénesis, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). VEGF es una familia de proteína que incluye VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. Transmite señales claves para el desarrollo de la angiogénesis (Holmes y Zachary, 2005) en conjunto con el microambiente tumoral, el cual desempeña un papel protagónico para el desarrollo del tumor.

Microambiente Tumoral

El microambiente tumoral está compuesto por matriz extracelular (ECM), así como diferentes tipos celulares tales como: fibroblastos, células neuroendocrinas, células adiposas, células inmunoinflamatorias y finalmente las redes vasculares sanguíneas y linfáticas. (Bonnans et al., 2014). Los avances recientes en la inmunología tumoral han demostrado que el tumor recluta y altera activamente los fenotipos y las funciones de las células inmunes, promoviendo la supresión inmune o la tolerancia de los antígenos asociados al tumor (Sever & Brugge, 2015). Las alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a la transformación neoplásica, generando señalizaciones intracelulares que confieren a la célula la capacidad de evadir los mecanismos intrínsecos y extrínsecos favoreciendo su promoción, progresión y crecimiento. (Arango Prado & Rodríguez-Padilla, 2016). Además de evadir el sistema inmune del huésped, para que el tumor pueda desarrollarse necesita un suministro constante de nutrientes y oxígeno, esto lo obtiene de la

sangre mediante la emisión de señales químicas que estimulan la angiogénesis en el microambiente circundante. La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente. Este es un proceso clave en algunos eventos fisiológicos, tales como el cierre de heridas, crecimiento celular y el desarrollo embrionario/fetal (Kurzyk, 2015).

Evidencia reciente indica que las células tumorales con alta agresividad son capaces de adquirir características de células endoteliales para imitar una red de vasos sanguíneos dentro del tumor y de esta forma aportar nutrientes y oxígenos vía endotelial o mecanismos alternativos de la vascularización del tumor (Fig.3).

a) **Brote de angiogénesis:** el crecimiento de nuevos vasos capilares a partir de los preexistentes, está regulado principalmente de forma paracrina por factores de crecimiento angiogénicos que son expresados por tejidos hipóxicos. Proteínas plasmáticas, particularmente fibrinógeno que se extravasan y forman una matriz provisional, que luego se utiliza para la migración de células endoteliales (CE) y la formación de tubos (Chong et al., 2017).

b) **La angiogénesis intususceptiva:** La angiogénesis intususceptiva es un proceso intravascular dinámico capaz de modificar drásticamente la estructura de la microcirculación. La característica estructural distintiva de la angiogénesis intususceptiva es el pilar intususceptivo, una microestructura cilíndrica que se extiende por la luz de los vasos y capilares pequeños. La extensión del pilar intususceptivo parece ser un mecanismo para podar vasos redundantes o ineficaces, modificar el ángulo de ramificación de los vasos bifurcados y duplicar los vasos existentes. (Mentzer & Konerding, 2014).

c) **Co-opción o coaptación vascular:** La cooptación vascular es un mecanismo en el que los tumores obtienen un suministro de sangre secuestrando la vasculatura existente, de esta manera las células tumorales migran a lo largo de los vasos sanguíneos del órgano huésped. Puede ocurrir en muchas neoplasias malignas,

pero hasta ahora se ha informado sobre todo en tejidos muy vascularizados como el cerebro, los pulmones y el hígado (Donnem et al., 2013).

d) **Vasos en mosaico:** Las células de melanoma pueden formar parte de las paredes de los vasos sanguíneos asociados a tumores, formando los denominados vasos en mosaico (Chang et al., 2000).

e) **Mimetismo vasculogénico:** El mimetismo vasculogénico (VM) es un sistema de suministro de sangre a los tumores que tiene lugar independientemente de la angiogénesis o las células endoteliales, y se asocia con una supervivencia deficiente en pacientes con cáncer. Hay dos tipos principales de mimetismo vasculogénico: tubular y modelado. El primero es morfológicamente similar a los vasos sanguíneos normales, mientras que este último es visiblemente diferente aunque capaz de anastomosis con los vasos sanguíneos (Fernández-Cortés et al., 2019).

f) **Vasculogénesis derivada de la médula ósea:** Se cree que las células precursoras hematopoyéticas derivadas de la médula ósea (MO) participan en el crecimiento de los vasos sanguíneos durante la vasculogénesis posnatal, además del reclutamiento de endotelio circulante células precursoras del tumor, su integración en la pared del vaso y su diferenciación terminal en CE (Pastushenko et al., 2014) .

Si bien todos los procesos angiogénicos tumorales son importantes, es de nuestro interés recalcar dos tipos específico de angiogénesis tumoral que son el “Brote de angiogénesis” y “Angiogénesis intusceptiva”, esto debido a que son modelos en que la célula de melanoma entra en contacto de manera directa con el flujo y sus fuerzas físicas, pudiendo ser su actividad modulada por el tipo de estrés de roce que posee el individuos ya sea laminar (fisiológico) o turbulento (patológico) (Pastushenko et al., 2014).

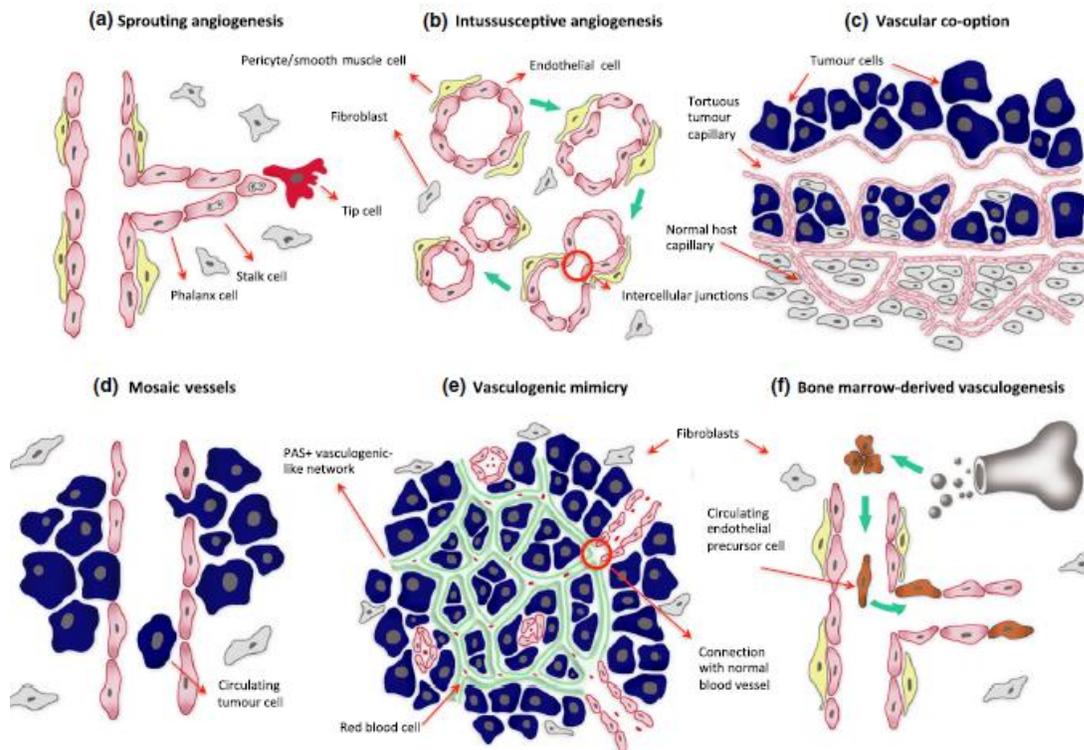


Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos alternativos de vascularización en tumores, incluida el melanoma. (Pastushenko et al., 2014).

Señalización Tumoral bajo estrés de roce

Se sabe que las fuerzas mecánicas sanguíneas como el estrés de roce juegan un papel clave en desarrollo, invasión y metástasis tumoral. Normalmente, el estrés de roce es una de las fuerzas prominentes a las que están expuestas las células endoteliales, las que transducen estas fuerzas en señales bioquímicas que regulan la expresión génica y el comportamiento celular a través de mecanismos vías especializadas, pero como mencionamos previamente también es posible que las células tumorales entren en contacto directo con estrés de roce afectando su viabilidad (Kämmerer et al., 2017). Las células tumorales experimentan dos tipos principales de estrés: 1) el estrés generado por el flujo sanguíneo en el microambiente vascular y 2) el generado por los flujos intersticiales en el microambiente tumoral. En cuanto a este último flujo, hasta hace poco, se pensaba que era principalmente pasivo en el transporte y diseminación de las células

cancerosas a los sitios metastásicos. Con investigaciones que abarcan la última década principalmente, se ha observado que el flujo intersticial tiene un efecto promigratorio sobre la invasión de células cancerosas en múltiples tipos de cáncer. Sin embargo no están claros los efectos que pueden generar las células tumorales sometidas a estrés de roce en células del vaso sanguíneo (Huang et al., 2018).

Foco del estudio

Si bien existe innumerable evidencia de los efectos del estrés de roce sobre células vasculares, no existe claridad sobre los efectos directos del estrés de roce como fuerza física modeladora en células de melanoma y las consecuencias de este estímulo en el modelamiento del microambiente tumoral dado por sustancias vasoactivas liberadas por la misma célula cancerígena expuesta a estrés de roce tanto fisiológico como patológico. Resultados previos obtenidos por nuestro laboratorio, han mostrado que las células de melanoma son sensibles al estrés de roce, modificando su orientación con respecto a este, dando a entender que pudiese poseer algún mecanismo intrínseco de mecanotransducción figura 4. Además, se ha observado que al estimular células de melanoma con estrés de roce diferencial; estas células son capaces de liberar factores angiogénicos al medio figura 5. Estos factores pueden estar modulando y alterando el microambiente tumoral vascular local. Cabe destacar que dentro de estos factores los que poseen una mayor liberación de angiopoyetina 2 (Ang-2), PLGF e IL-8. Por esta razón esta investigación pretende estudiar el efecto del estrés de roce fisiológico (Laminar) y patológico (turbulento) sobre las células de melanoma y como el medio condicionado obteniendo de células de melanoma sometida a diferentes condiciones midiendo proliferación, migración y angiogénesis (Letelier, 2007).

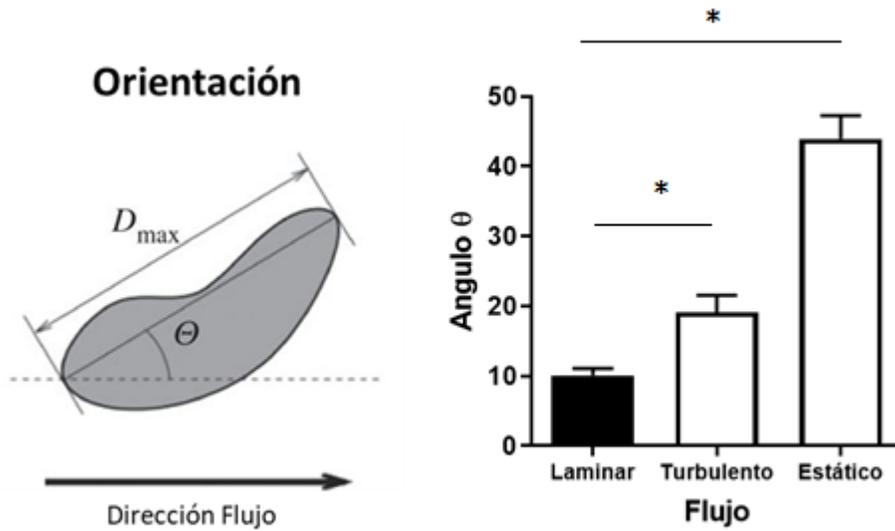


Figura 4. Comparación de alineamiento de células de melanoma con respecto a la dirección del flujo. Los datos fueron obtenidos luego de someter células de melanoma a condiciones estática, flujo laminar y flujo turbulento. Se analizaron las imágenes de las células mediante el programa. Image J donde se analizó el alineamiento de las células respecto a la dirección del flujo, ángulo θ . Se observó que el estímulo estático genera una media de distribución al azar (45) mientras que el flujo turbulento alinea las células de melanoma con respecto a la dirección de flujo, dando a entender que las células poseen algún tipo de mecanoreceptor. Se realizó un análisis Estadístico ANOVA una vía * $P < 0.05$ donde existe diferencias significativas entre el flujo turbulento versus flujo laminar. (Rodríguez et al. Datos no Publicados).

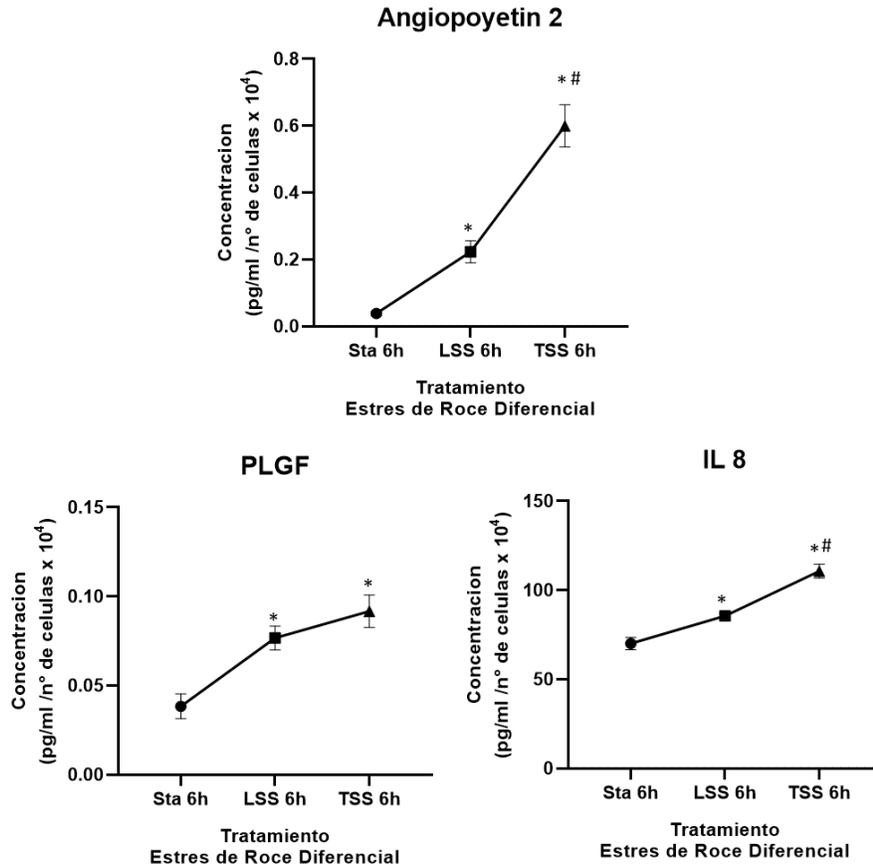


Figura 5. Biomoléculas enriquecidas en el medio acondicionado por efecto de estrés de roce diferencial. Sta (sin estrés de roce), LSS (Estrés de roce laminar) y TSS (Estrés de roce turbulento) La concentración de las moléculas (pg / mL) se normalizó por el número de células adheridas a la placa después de 6 horas de estrés de roce. Los puntos del gráfico representan la dispersión de los valores de las réplicas experimentales, con media y error estándar. La prueba utilizada fue la ANOVA bidireccional seguida de la prueba de Bonferroni. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001. (Ferreira et al. Datos no Publicados)

Estado del Arte-Factores Angiogénicos

Si bien en la presente tesis no se logró medir las señalizaciones de la vía Ang 2, este fue siempre el objetivo original que no se pudo realizar debido a las restricciones de movimiento de personas y reactivos en el país. Consideramos dejar el texto para que los revisores se generen una idea más completa y el alcance del proyecto original.

Con el objetivo de facilitar la lectura e interpretación de los resultados obtenidos definiros de manera breve la vía PLGF, IL 8 y en extenso la vía Ang -2 en angiogénesis debido a que son factores liberados por la célula de melanoma sometidas a estrés de roce como se mencionaba en párrafos anteriores.

El factor de crecimiento placentario (PlGF)

Es un gen codificador de proteínas angiogénicas de aproximadamente 30 kDa sintetizada principalmente en la placenta. Es una proteína que pertenece a la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). PlGF se asocia en condiciones fisiológicas con la angiogénesis y el desarrollo adecuado de los vasos sanguíneos en la placenta para un desarrollo embrionario adecuado, sin embargo esta proteína se ve disminuida cuando una mujer presenta preeclampsia, es decir alta elevada presión arterial en el embarazo. Esta proteína también se ve expresada en órganos como el corazón, los pulmones, músculo esquelético, entre otros (De Falco, 2012).

En cuanto al rol que juega en el cáncer, se ha demostrado que PlGF se expresa por ejemplo en el carcinoma de células renales hipervasculares y actúa como un regulador positivo del crecimiento y metástasis del cáncer. PlGF está altamente regulado transmite su señal a través de Flt1 (Receptor de tirosina quinasa 1) y es un receptor de VEGF. Este receptor se encuentra elevado en mujeres con preeclampsia generando e igualmente juega un papel fundamental en la angiogénesis patológica como por ejemplo en la carcinogénesis estimulando el crecimiento tumoral.

Por lo tanto, la inhibición de PIGF podría proporcionar un medio atractivo el control del cáncer (Majed & Khalil, 2012).

Interleucina 8 (IL-8)

IL-8 es una quimiocina proinflamatoria producida por macrófagos y otros tipos de células como músculo liso y células endoteliales. En los seres humanos, la proteína IL-8 está codificada por el gen CXCL8. IL-8 estimula angiogénesis y proliferación de células tumorales, esto incluye la expresión en tumores sólidos como en: cerebro, mama, cuello uterino, colon, gástrico, pulmón, melanoma, mesotelioma, ovario, próstata, renal y tiroides. IL-8 señala a través de la unión con los receptores acoplados a proteína G y receptor 1 de quimiocina cisteína-X-cisteína (CXCR1, IL-8R α) o CXCR2 (IL-8R β) a la activación de múltiples vías de señalización primarias descendentes, incluida la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) / Akt, la fosfolipasa C (PLC) / proteína quinasa C (PKC) y la proteína quinasa activada por la vía de mitógenos kinasa (MAPK), así como la activación de la quinasa de adhesión focal (FAK) y las GTPasas de la familia Rho quien tiene efectos importantes en diversas enfermedades cardiovasculares y enfermedades vinculadas con el cáncer igual que angiopoyetina 1 y 2

Angiopoyetina (Ang-2)

Este gen pertenece a la familia de factores de crecimiento de la angiopoyetina de 70 kDa. La proteína codificada por este gen es un antagonista de la angiopoyetina-1, y tanto la angiopoyetina 1 como la angiopoyetina 2 son ligandos para la tirosina quinasa del receptor de TEK endotelial. La Angiopoyetina (Ang) Ang-1 activa la señalización mediada por el receptor Tie2 mientras que Ang-2 inhibe esta activación. Ang-2 es un desestabilizador de vasos producido casi exclusivamente por las células endoteliales (Thurston & Daly, 2012). Ang-2 es el principal ligando de angiopoyetina en tumores y actúa en forma coordinada con VEGF.

Investigaciones recientes han demostrado un efecto proangiogénico de Ang-2, ya que el uso de inhibidores de Ang-2 en tumores ha llevado a una disminución en el crecimiento de esta masa, junto con una reducción de la proliferación endotelial (Felcht et al., 2012). Sin embargo el papel de Ang-2 en la angiogénesis tumoral ha causado disensión ya que en algunos estudios realizados en ratones y en humanos se ha visto una sobreexpresión de Ang-2 en cáncer y se ha observado igualmente un aumento en la angiogénesis y el crecimiento tumoral. En contraste estudios arrojaron como resultado que la inducción específica de Ang-2 en carcinomas mamarios y carcinomas de pulmón inhibieron el crecimiento tumoral y la metástasis (Prager et al., 2012). Es por ello la necesidad de seguir estudiando esta quinasa en células cancerígenas de diversas líneas (Song et al., 2012). Tie1 y Tie2 son receptores de la familia tirosina quinasa (TKR) que están asociados con proliferación y diferenciación de células tumorales. Ambos poseen dominios extracelulares múltiples únicos. Al igual que los receptores VEGF, Tie1 y Tie2 están altamente expresados y juegan papeles críticos durante el desarrollo embrionario (Lemmon & Schlessinger, 2010) Tie2 se identificó inicialmente como un receptor que controlaba varias propiedades de las células endoteliales en condiciones fisiológicas y patológicas. Posteriormente se descubrió que las angiopoyetinas, modulan la señalización dependiente de Tie2, que a su vez regula la supervivencia y la apoptosis de las células endoteliales, controla la permeabilidad vascular y además regula el brote capilar que ocurre durante la angiogénesis normal, y también parece jugar un papel crucial en varias anomalías vasculares, como las malformaciones venosas en el cáncer (Song et al., 2012), ya que se descubrió que Tie2 estaba sobreexpresado en vasos tumorales. Se ha observado que Tie2 también se expresa fuera del compartimento vascular en varios tipos de cáncer, incluida la leucemia y las neoplasias sólidas. Por lo tanto, Ang-2 actúa como eje de señalización en endotelios dañados, por lo tanto, patológico generando un proceso de inflamación sistémica. (Akwii et al., 2019).

Regulación de la señalización angiopoyetina 1 y 2 en patologías vasculares

La noción de que el sistema Ang / Tie contribuye a la patogénesis de la enfermedad está respaldada por estudios clínicos y estudios en modelos animales. Esta vía se ha visto mutada en personas con trastornos cardiovasculares observándose un aumento en las concentraciones de Ang-2, junto con los marcadores de activación plaquetaria, angiogénesis e inflamación. Este efecto se repite en personas con hipertensión e insuficiencia cardíaca y síndrome coronario agudo.

El sistema de señalización de las angiopoyetinas consta de cuatro ligandos y dos receptores. Los ligandos son Ang-1, Ang-2, Ang-3 y Ang-4, siendo las más investigadas Ang-1 y Ang-2. Mientras Ang-1 actúa como señal paracrina para la estabilidad del vaso fosforilando continuamente el receptor de tirosina Tie2, suprime igualmente la expresión del factor tisular inducido por VEGF y el factor de crecimiento tumoral alfa (TNF- α) suprimiendo la inflamación endotelial. Igualmente se ha observado que Ang-1 colabora en la construcción del vaso sanguíneo en crecimiento inhibiendo de esta manera la apoptosis celular mediante la activación de PI3K / Akt teniendo bajos efectos proliferativos en estas células. La activación del receptor Tie2 también inhibe la expresión dependiente de NF- κ B (actor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B) de genes inflamatorios como los que codifican moléculas de adhesión luminal). Por su parte Ang-2 genera una señalización autocrina por parte de la CE desestabilizando el vaso sanguíneo. Ang-2 es sometido por diversos efectos inflamatorios. Esta proteína actúa como un antagonista de Ang-1 inhibiendo la señalización del receptor Tie-2 aumentando VEGF quien a su vez genera disminución en el ensamblaje en la unión de célula-célula a través de la vía rhoa quinasa. Este proceso a su vez generará fuga capilar siendo un requisito previo para la migración celular y formación de nuevos vasos sanguíneos (Figura 6).

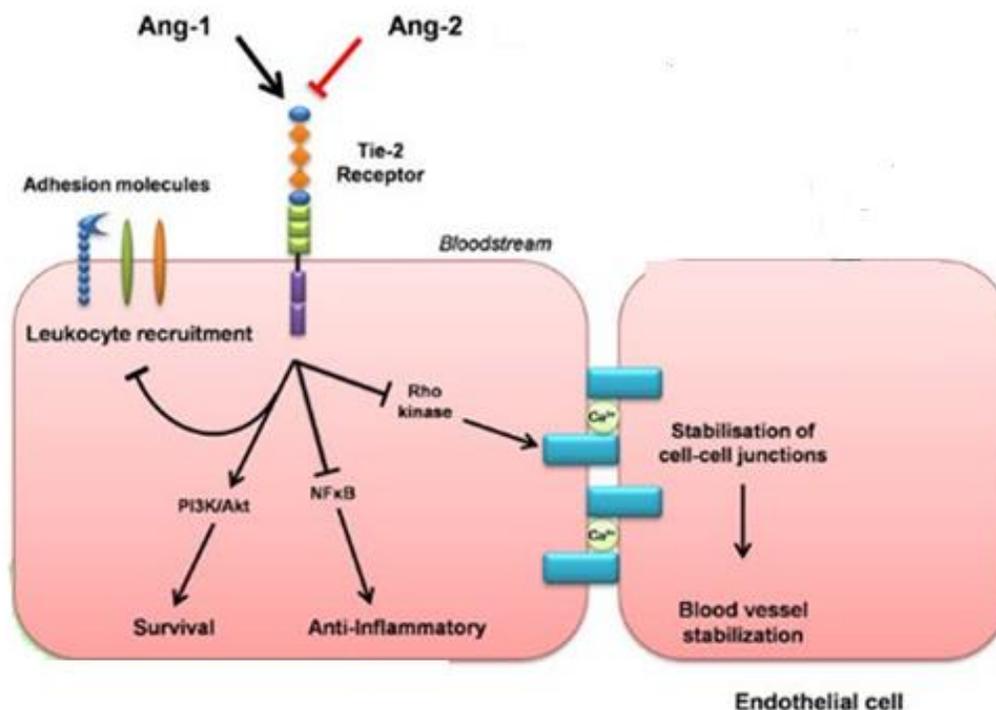


Figura 6. Vía de señalización de Angiopoietina 1 y 2 y el receptor Tie-2. Figura modificada de (Lukasz , Philipp Kümpers , y Sascha David., 2012).

Debido a todos los antecedentes mencionados en la introducción y que actualmente no se conoce el efecto del estrés de roce fisiológico o patológico en la liberación de sustancias pro-angiogénicas desde las células de melanoma y su efecto en el microambiente tumoral vascular, es que el objetivo de esta tesis es Determinar si el estrés de roce patológico sobre células de melanoma induce la liberación de mediadores biológicos que producen una angiogénesis patológica. Para ello se estudiará el efecto de medio condicionado de células de melanoma sometida a estrés de roce diferencial, sobre la proliferación, migración y angiogénesis endotelial

Nota: En el proyecto original el estudio era: estudiar el efecto de medio condicionado de células de melanoma sometida a estrés de roce diferencial, sobre la proliferación, migración y angiogénesis endotelial mediada por la vía angiopoietina-2/Tie2.

Hipótesis

Nos gustaría resaltar los siguientes antecedentes que conducen a nuestra hipótesis

1. El melanoma es la forma de cáncer de piel más peligrosa, por su alta metástasis y mal pronóstico.
2. Las células de melanoma con el fin de crecer y propagarse requieren nutrientes de la vasculatura aumentando la angiogénesis tumoral
3. La recíproca interacción entre el tumor y el microambiente es crucial en la metástasis y progresión del tumor
4. Las células cancerígenas dentro del microambiente tumoral pueden afectar severamente la biofísica del flujo sanguíneo, como el estrés de roce
5. Las células de melanoma sometidas a flujo turbulento pueden inducir cambios pro-angiogénicos y cambios en la vía de señalización y comunicación con la célula endotelial ubicadas en los vasos sanguíneos, dentro del ambiente tumoral
6. Las células de melanoma sometida estrés de roce provoca vasos sanguíneos irregulares, pudiendo inducir cambios pro-angiogénicos en la célula endotelial, vasos sanguíneos irregulares y flujo sanguíneo anormal facilitan el crecimiento y migración del tumor.
7. Actualmente, no existen estudios que vinculen directamente la fuerza de la hemodinámica vascular del melanoma y si genera cambio en la señalización, fenotipo y vascularización en la célula endotelial.

Considerando estos antecedentes se plantea el siguiente supuesto:

Hipótesis Final

Medio condicionados provenientes de células de melanoma sometidas a estrés de roce turbulento (patológico) inducen una mayor respuesta angiogénica en células endoteliales *in vitro*.

Hipótesis Original

Medio condicionados provenientes de células de melanoma sometidas a estrés de roce turbulento (patológico) inducen una mayor respuesta angiogénica en células endoteliales *in vitro*, **vía angiopoyetina-2/Tie-2**.

Objetivo General Final

Determinar si el estrés de roce diferencial derivado de células de melanoma aumenta las vías angiogénicas patológicas.

Objetivo General Original

Determinar si el estrés de roce diferencial derivados de células de melanoma inhibe la señalización vía receptor Tie2 generando un aumento de las vías angiogénesis patológicas.

Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de medios condicionados derivados de melanoma sometido a estrés de roce diferencial en la proliferación de células endoteliales.
- Identificar el efecto de medios condicionados derivados de melanoma sometido a estrés de roce diferencial en la migración de células endoteliales.
- Evaluar el efecto el efecto de medios condicionados derivados de melanoma sometido a estrés de roce diferencial en angiogénesis endotelial.

- Evaluar el efecto de medios condicionados derivados de melanoma sometido a estrés de roce diferencial en la vía de transducción del receptor Tie2. **(Este objetivo, no logró demostrarse debido a la pandemia mundial)**

Materiales y Métodos

Líneas celulares

Las células de melanoma humano SK-MEL-37 se cultivaron en medio MEM (Sigma Aldrich®) pH 7,2 y se suplementaron con suero bovino fetal al 10% (Life Technologies). Se cultivaron en DMEM High Glucose (Sigma Aldrich®) pH 7.2 suplementado con suero bovino fetal al 10% (Life Tecnologías). Las células se mantuvieron en una atmósfera húmeda a 37 ° C que contenía 5% de CO₂. Al alcanzar la confluencia, las células se lavaron con solución de PBS / EDTA, pH 7,2, se separaron de los matraces con solución de tripsina al 0,2% (Life Technologies) y se transfirieron a nuevos matraces de cultivo en una proporción de 1: 7.

Las células endoteliales hCMEC/D3

Se utilizó una línea celular de microvasculatura cerebral humana hCMEC/D3 (Merck, sigma-Aldrich, ref # SCC066, Alemania), se utilizaron cultivo celulares en placas previamente incubadas toda la noche con colágeno tipo I de cola de rata (CORNING, Discovery Labware, ref #354236, Lot #6207007, USA). Se usaron placas de 60 y 100 mm o 24 y 96 pocillos, dependiendo del requerimiento del ensayo a realizar. Estas fueron cultivadas con medio EndoGRO™ MV Supplement Kit (catalog # SCME004-S, Lot# 3035216) 37°, 21% de oxígeno y 5% de CO₂.

Estrés de roce

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, BODEL), utilizando el pegamento parafina - vaselina 3:1, las placas se pusieron

durante 10 min en una estufa para derretir el pegamento y que quedara sellado y adherido. A una de las placas se les agregó seis pelotitas de mismo pegamento para simular el estrés de roce turbulento. Las placas se esterilizaron a la luz UV durante 15 (ver figura 7)

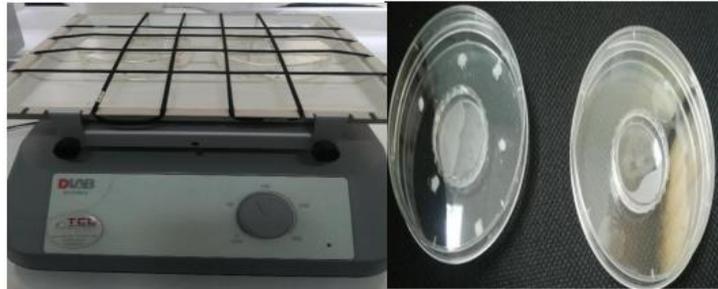


Figura 7. Montaje de placas para generar estrés de roce en el agitador orbital.

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 Skmel-37 se sometieron a estrés de roce utilizando la metodología descrita por de la Paz et al, 2012. 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 100mm con una confluencia ~80%- 85%. Se privaron de sueros durante toda la noche. Posteriormente las placas se sometieron a estrés de roce orbital durante seis horas (laminar y turbulento) (37°C, 5% CO₂) 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 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 = radio de rotación orbital (5,25 cm), ρ = densidad del medio (1,0 g / mL), η =

viscosidad del medio ($7,8 \times 10^{-3}$ dinas*s / cm²) y f= frecuencia de rotación (rotaciones / segundo) (ver fórmula 1).

Usando esta ecuación, se sometieron las células a roce laminar de 0,5 N / m², que está dentro del rango capilar fisiológico. Para generar estrés de roce patológico (turbulento), a las placas se le adicionaron obstáculos físicos no uniformes con el pegamento formado de vaselina y parafina en su relación descrita anteriormente. Finalmente se realizaron dos controles uno es una condición estática la cual fue vertido el medio condicionado provenientes de células de melanoma de las células de melanoma a las células endoteliales, sin embargo no se llevó esta placa al agitador, se utilizaron como control. Las magnitudes y frecuencias utilizadas para estos experimentos se eligieron para ser coherente con los encontrados en la vasculatura (Jo et al., 1991).

r = radio de la rotación orbital (3.25 cm)

f = frecuencia de rotacion (rotaciones/segundos)

V= $2\pi r \times f$

ρ = densidad de medio (1.0 g/ml)

η = Viscosidad del medio (7.8×10^{-3} dinas·s/cm²)

D= diametro partícula (0.5 cm)

$$Re = \frac{(v * D * \rho)}{\eta}$$

Fórmula 1. Cálculo de número de Reynolds para nuestro sistema experimental de estrés de roce diferencial

Fluorometría de Laser Speckler

La adquisición de velocidades de flujo sanguíneo y tiempos de descorrelación *in vitro* se realizó utilizando el sistema integrado Pericam PSI HR utilizando tecnología de contraste de Laser Speckle (LASCA), lo que permite la grabación de imágenes

y obtener una distribución de valores cuantificables del flujo, mediante valores arbitrarios, cuantificables mediante escala asignada de colores. En este caso se midió la placa donde se sembraron células de melanoma en una condición turbulenta con un caudal (fuerza por área) de 0.5 N/m^2 y 1 N/m^2 .

Extracción de proteínas

Para obtener extractos de proteínas se disgregaron con tripsina y se lavaron con 1X PBS y se resuspendieron en buffer de lisis NP40 Cell Lysis Buffer (Invitrogen - Life Technologies) (Tris 50 mM, pH 7,4; NaCl 250 mM; EDTA 5 mM ; NaF 50 mM; Na_3VO_4 1 mM; Nonidet P40 al 1% y NaN_3 al 0.02%) más $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ de aprotinina y PMSF 1 mM. El homogeneizado se incubó durante 30 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y luego se centrifugó durante 15 minutos, 13000 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. El medio condicionado provenientes de células de melanoma se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo y se almacenó a -20°C . Para determinar la concentración de proteína de los extractos, utilizando el kit ioAgency "BCA Protein Assay - Modified Lowry Method".

Ensayos funcionales

Proliferación celular

Las células endoteliales extraídas de la microvasculatura del cerebro fueron cultivadas en las condiciones descritas por el fabricante y reportado previamente por (Maghnie) (Maghnie et al., 1998). Se procedió a plaquear en placas de 96 pocillos, incluyendo 7×10^3 células en M199 suplementando con 20% de suero fetal bovino, las células se mantuvieron en crecimiento a 37°C , 5% CO_2 por 12 horas. Posterior a ello se inició la deprivación de suero en M199, 2% SFB, la proliferación se evaluó mediante el reactivo de marcaje (Kit 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU)/ELISA), para finalmente determinar la incorporación del marcaje según

indicaciones del fabricante y reportado por (Matson & Cook, 2017). Finalmente se lee la placa a 405 y 492 nm y se obtiene la diferencia para su cuantificación.

Migración celular.

Para averiguar si los medios condicionados obtenidos con las células melanoma estimulado por estrés de roce laminar y turbulento aumentan in vitro la migración de células endoteliales se realizará un ensayo de herida y ensayo transmigración con insertos de membrana. Para el ensayo herida, se siembra las células endoteliales en placas de 24 pocillos. Cuando estén 80% confluentes, las células se lavaron y privaron de suero durante la noche, transcurrido este tiempo se realizará el raspado con una punta amarilla 200 μ L, los pocillos se lavarán con PBS 1x, se colocará 200 μ L del medio de cultivo condicionado, se deja incubar por 24 horas. Se realizará un seguimiento de la migración con imágenes del raspado las cuales se capturará con un sistema de cámara digital a 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h (ampliación, \times 20). Se evaluó el área de la herida mediante el programa Image J- NIH con el software de complemento de Angiogénesis (DeCicco-Skinner et al., 2014).

Ensayo de formación de tubos.

Las células endoteliales se dejarán crecer en una placa de 24 pocillos hasta una confluencia del 70%, Posteriormente se estimularán con los medios condicionados durante 24 horas, luego las células endoteliales sometidos se sembrarán en una matriz de extracto de membrana basal, este procedimiento las indujo a diferenciarse y formar estructuras similares a tubos cuando se cultivan. Estos tubos contienen lumen rodeado por células endoteliales unidas entre sí a través de complejos de unión. Finalmente, se utilizó Image J- NIH con el software de complemento de Angiogénesis para detectar nodos, tubos o mallas que luego se pueden cuantificar (DeCicco-Skinner et al., 2014).

Análisis estadístico

Los grupos se compararon mediante análisis no paramétrico (prueba de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, según corresponda). Los valores se presentan como S.E.M. según corresponda. $P < 0,05$ es considerado estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS en su versión 20.

IV Resultados

Según los cálculos teóricos, el volumen de los obstáculos supera el número teórico de Reynolds para nuestro sistema (sobre 50 para vasos con menos de 1mm), por lo que el estrés de roce sería turbulento, bajo nuestras condiciones experimentales (Formula 1). Sin embargo, para corroborar estos datos teóricos, el flujo en las placas de cultivo fue medido mediante análisis de contraste de imágenes de láser Speckle observándose que los obstáculos de parafina generan un flujo caótico. La condición turbulenta ya sea sujeta a un caudal (fuerza por área) de 0.5 N/m^2 o 1 N/m^2 presenta, en el gráfico de cajas y bigotes, una mayor desviación estándar y una distribución más amplia de valores mínimos y máximos, esto se condice con un comportamiento más caótico de flujo. Además, las imágenes observadas de ejemplo muestran sitios de color azul en la condición turbulenta donde el flujo es menor, el cual se condice con la posición de los obstáculos de cera de parafina. (Fig. 8).

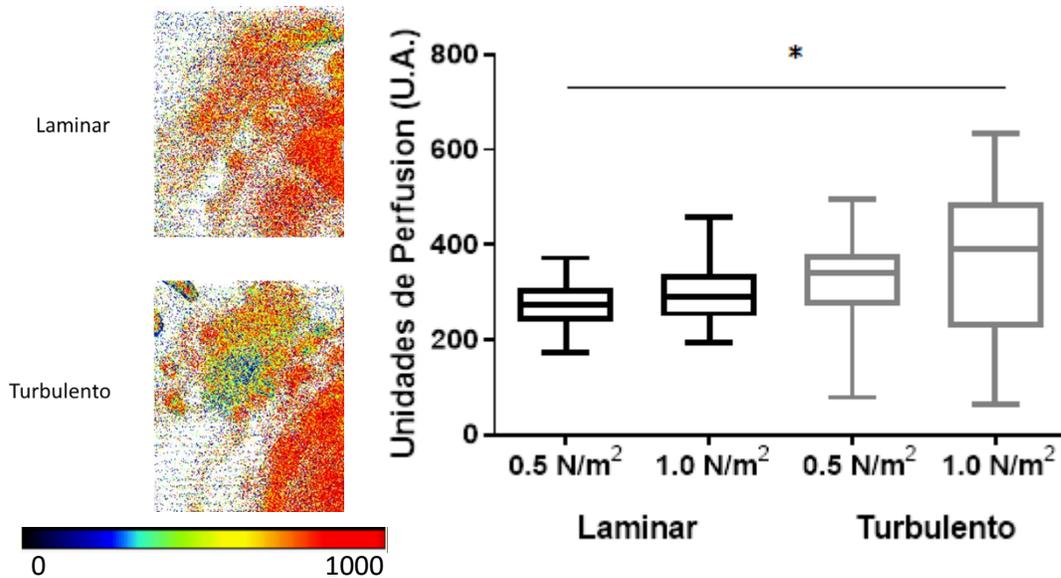


Figura 8. Las imágenes del lado derecho de la figura, representan uno de los cientos de fotogramas de la captura Doppler, se puede observar que la inclusión del obstáculo genera un flujo menos parejo (distintos colores). El Grafico de caja y bigotes del lado izquierdo presentan los datos numéricos de flujo, se puede observar que el flujo turbulento presenta una diferencia significativa en la dispersión de datos que el flujo turbulento versus laminar $p < 0.05$ en 0.5 N/m^2 y 1.0 N/m^2 mediante el análisis estadístico Kruskal Wallis.

Con el objeto de determinar si el flujo desprendía células de la placa, se evaluó el número de células flotantes a las dos, seis y 24 horas de estimulación de roce diferencial (Fig. 9), Se pudo observar que a las dos y seis horas no había efecto en el desprendimiento de las células. Debido a esto se adoptó el tiempo de 6 horas de estimulación para provocar una mejor liberación de las sustancias vasoactivas liberadas por el melanoma. Datos de colaboradores, previamente habían de mostrado que a las seis horas de estímulo de estrés de roce diferencial no había diferencia en la apoptosis celular con respecto a la condición estática (Dato no mostrado).

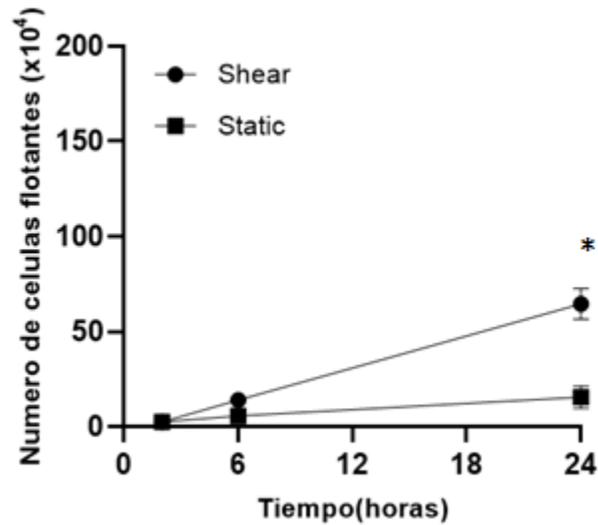


Figura 9. Números de células muertas utilizando el modelo de placa concéntrica. Las células en suspensión luego del estrés de roce se recogieron y fueron contadas en una cámara de Neubauer. Cada punto de la curva representa la media y el error estándar del número total de células en cada condición y tiempo de muestra. La estadística utilizada fue U de Mann Whitney $p < 0.05$

Medios Condicionados derivados de Células de Melanoma

Una vez transcurridas las seis horas de estímulo en las diferentes condiciones se obtuvo el medio condicionado proveniente de células de melanoma a los cuales se les determinó la concentración de proteínas con el objeto de estandarizar las distintas replicas, para después vértelos a células endoteliales para realizar los ensayos. A continuación, se estandarizó la cantidad de proteína con las que se estimuló las CE mediante el método Bradford. Para ello se hicieron cálculos matemáticos de acuerdo al volumen recomendable en literatura con respecto a estímulos con medio condicionado en placas de 24 y 96 pocillos 0,3 ml y 0,07 ml respectivamente (Buchanan et al., 2014).

Medio Condicionado 0.5x y 1.0x

Optamos por estandarizar mediante cantidad de proteínas y unir todos los medios condicionados provenientes de células de melanomas de los estímulos de células de melanoma por estrés de roce diferencial en una sola solución maestra para evitar posibles diferencias en la obtención del medio condicionado de células de melanoma en las tres condiciones previamente descritas. Se procedió a realizar los cálculos para obtener dos concentraciones de soluciones 0.5x y 1.0x. Para la obtención de estos volúmenes se realizó el siguiente cálculo: La concentración estándar de proteína fue de 3,7 mg/ml e igualmente se determinó la concentración de proteína de los tres medios: Turbulento 4 = mg/ml, Laminar = 6,75 mg/ml y estático = 3,67 mg/ml mediante el kit BioAgency "BCA Protein Assay" como se explicó anteriormente en la sección de metodología. Una vez obtenido estos valores se procedió a dividir la concentración estándar por la concentración de proteína del medio condicionado, donde se multiplicó por el volumen del pocillo según correspondía el ensayo a realizar. Finalmente, el resultado obtenido para 1.0x se dividió por dos y se obtuvo la cantidad volumen para 0.5x (ver tabla 1). De esta manera se unificaron criterios debido a que la literatura en general se hace una relación de volumen 1:1 sin considerar concentración de proteínas.

Tabla 2. Valores para obtener la concentración de sustancia vasoactivas de medio condicionado de célula de melanoma. Volúmenes 1.0x y 0.5x de cada medio condicionado en placas de 24 y 96 pocillos.

Conc. final prot.= concentración final de proteínas

24 pocillos (0,3 ml)	0.5x	conc. final prot.	1.0 X	conc. final prot.
Turbulento (ml)	0,14	3,7 mg/ml	0,28	7.4 mg/ml
Laminar (ml)	0,08	3,7 mg/ml	0,16	7.4 mg/ml
Estático (ml)	0,15	3,7 mg/ml	0,3	7.4 mg/ml
96 pocillos (0,07ml)	0.5x	conc. final prot.	1.0 X	conc. final prot.
Turbulento (ml)	0,03	3,7 mg/ml	0,06	7.4 mg/ml
Laminar (ml)	0,02	3,7 mg/ml	0,04	7.4 mg/ml
Estático (ml)	0,04	3,7 mg/ml	0,07	7.4 mg/ml

Proliferación celular.

La proliferación celular se define como un aumento del número de células como resultado del crecimiento y la multiplicación de estas. En un estado patológico como el cáncer, las células pueden exhibir altas tasas de proliferación siendo colaborado por la microvasculatura de los vasos sanguíneo.

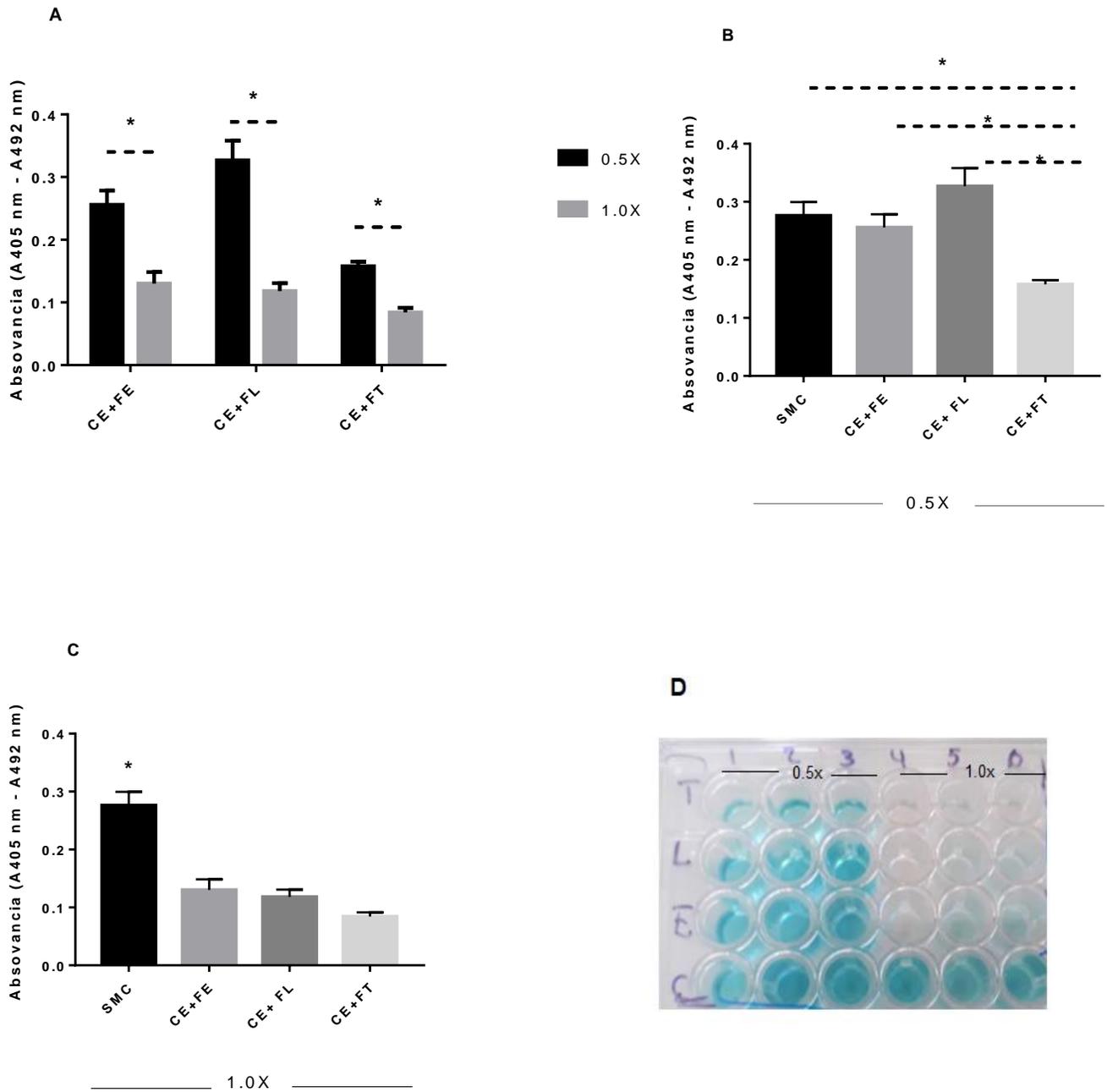
El endotelio vascular es un "órgano" celular dinámico que controla el paso de nutrientes a los tejidos, como las células tumorales. Los vasos sanguíneos de los tumores tienen diámetros irregulares; son frágiles, tienen fugas y el flujo sanguíneo es anormal (Dudley, 2012).

Por estas razones evaluó la proliferación de la célula endoteliales sometidos con medio condicionado provenientes de células de melanoma y se compararan a la CE sometidos con medio condicionado provenientes de la célula de melanoma expuesta a diferentes condiciones (E, FL y FT) y se hallaron diferencias significativas entre la concentración 0.5x y 1.0x ($p < 0,05$) como se observa en el gráfico (fig. 10A).

En todas las condiciones de estrés de roce el aumento en la concentración de señales derivadas del medio condicionado, produce una disminución en la proliferación endotelial. Esto nos indica que las sustancias producidas por el melanoma estarían inhibiendo las vías proliferativas endoteliales. Si bien no podemos descartar también un aumento de las vías apoptóticas, las observaciones de las placas de cultivos al compararlas a las tratadas sin medio condicionado no mostraban mayor cantidad de células flotantes.

Se evaluó igualmente el efecto de proliferación de células endoteliales que fueron sometidos con medio condicionado provenientes de células de melanoma con una concentración de 0.5x (fig.10 B) y no se observa diferencias significativas entre los grupos excepto el flujo turbulento ($p= 0,001$) el cual produjo una baja proliferación endotelial (fig.10 D)

En la (fig. 10 C) Se evaluó el efecto de proliferación endotelial con una concentración 1.0 x y se encontró una disminución en la proliferación por parte del resto de los grupos con respecto al grupo de células endoteliales con medio deprivado ($p< 0,05$). Esta disminución en la proliferación puede deberse a que el medio está más concentrado.



En la figura 10. SMC= Célula endotelial sin medio deprivado; E= Condición estático, FL= Flujo laminar, FT= Flujo turbulento. **A)** Se comparó la absorbancia por flujo entre ambos volúmenes 0.5x y 1.0x mediante el estadístico U de Mann-Whitney. **B)** Se evaluó la proliferación entre los dos flujos, además se agregó un cuarto grupo de células sin medio condicionado (SMC) con un volumen 0.5x **C)** Se evaluó la proliferación entre los dos flujos más células sin medio condicionado con un volumen de 1.0x **D)** se observa la proliferación donde se da principalmente en un volumen de 0.5x. Se utilizó la prueba Kruskal Wallis para comparar los grupos; * Significativo $p \leq 0,05$.

Resumen de resultados obtenidos en proliferación celular.

- Medios condicionados 0.5 x nos disminuye proliferación excepto turbulento.
- Medios condicionados 1.0 x disminuye el efecto de la proliferación.
- Se evidenció que un volumen más concentrado 1.0x genera una menor proliferación que una concentración más baja (fig.10 D). Las células endoteliales (CE) estimuladas con medio condicionado proveniente de células de melanoma sometida a condiciones turbulentas con una condición 0.5x presenta un 33-40% menos de proliferación celular con respecto al resto de los grupos, sin embargo con una condición 1.0x este porcentaje disminuye con respecto a las células endoteliales estimuladas con medio condicionados provenientes de células de melanoma, no así con el grupo de células endoteliales que no poseen medio condicionado donde mantiene un 33% menos de proliferación celular.

Migración celular

Uno de los principales procesos involucrados en la angiogénesis es la migración de las células endoteliales. La migración endotelial se puede observar en procesos de la cicatrización de heridas donde las plaquetas secretan mediadores vasoactivos previniendo la pérdida excesiva de sangre al formar un bloqueo temporal para llenar las áreas heridas sin tejido. Un exceso o deficiencia en la migración puede conllevar a la generación de un vaso sanguíneo disfuncional los cuales se podrían producir por aumento de factores de crecimiento y citoquinas, aun cuando esto no está confirmado. Los vasos tortuosos podrían ser beneficiosos para el cáncer, ya que los procesos biofísicos involucrados serían deficientes, permitiendo una menor resistencia y un mayor flujo sanguíneo a la célula maligna. En este sentido los ensayos *in vitro* son enfoques excelentes para extrapolar situaciones *in vivo*.

Otro factor interesante al tener un vaso sanguíneo disfuncional es que facilita la posible salida del tejido de origen del tumor al torrente sanguíneo pudiendo invadir otros tejidos, en el proceso conocido como metástasis.

Al comparar los medio condicionado obtenido de células de melanoma y verterlo a las células endoteliales para evaluar su efecto se observa que con una concentración 0.5x existe una mayor migración por parte de las CE estimulada con medio condicionado de células de melanoma expuestas a flujo turbulento (CE+FT) con respecto al resto de las condiciones a partir de las 8 horas post herida ($p < 0,05$) (fig.11 A), sin embargo esta diferencia se acrecienta a partir de las 20 y 24 horas ($p = 0,01$).

Con una concentración de 1.0x se observa el mismo efecto que la concentración 0.5x (fig. 11 B), sin embargo, a la hora 16 post herida genera una diferencia muy significativa ($p = 0,01$) a excepción CE estimulada con medio condicionado de células de melanoma expuestas a flujo laminar (CE + FL) ($P < 0.05$).

Los gráficos de la figura (11 A) y (11 B) contienen mapas de calor, que muestra con un color blanco las áreas más pequeñas y con un color azul oscuro los tamaños de áreas más grande permitiendo una mayor visualización para el lector, igualmente el

gráfico (11 C). Donde se demuestra que el flujo turbulento presenta zonas más claras que el resto de los medios como el flujo laminar y estático.

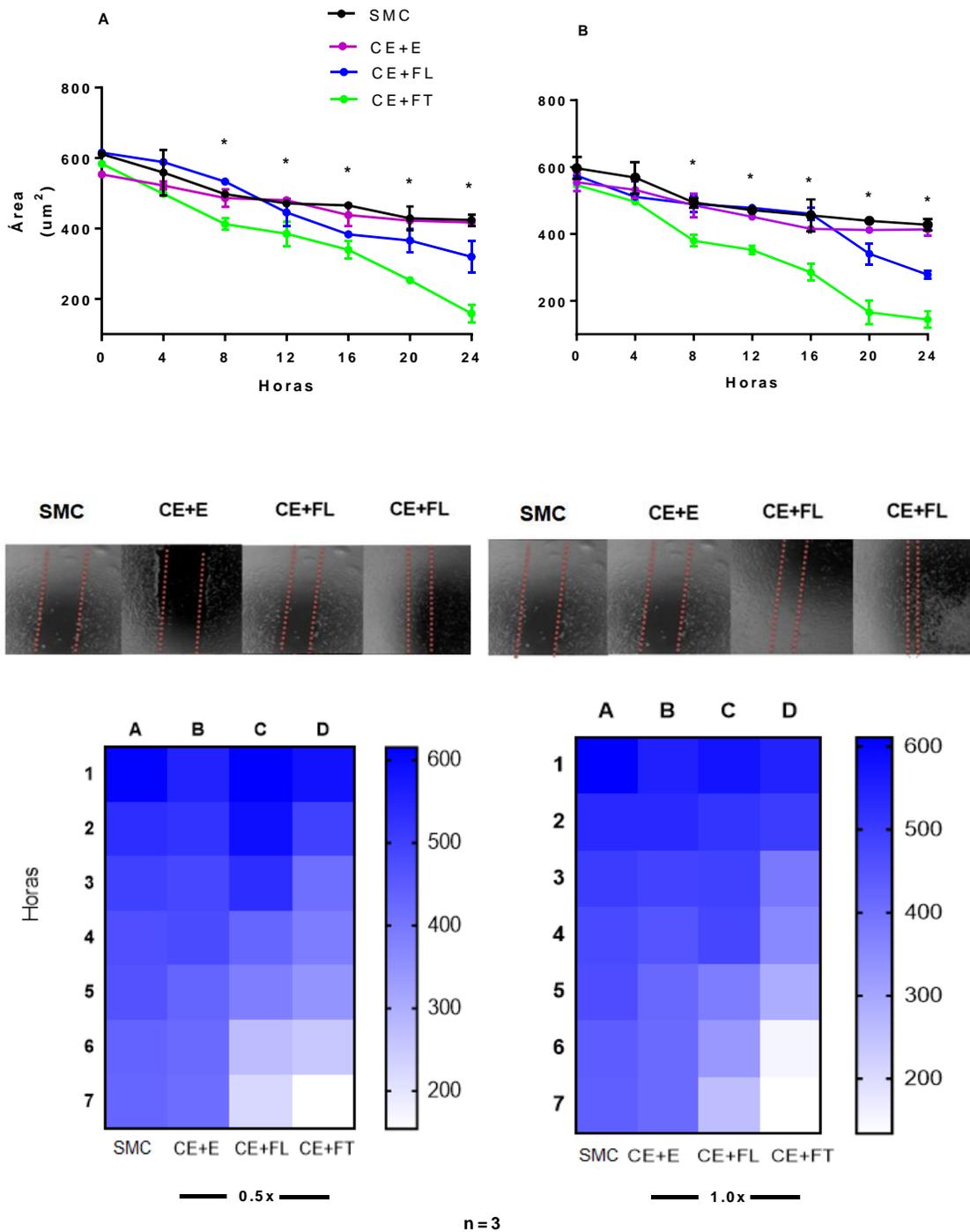


Figura 11. A) Se compara el efecto que produce cada flujo con respecto al cierre de la herida en un volumen de 0.5x, además de mapa de calor para la visualización de las áreas y en B) Se compara el efecto que produce cada flujo con respecto al cierre de la herida en un volumen de 1.0x apoyado con un mapa de calor para su visualización C) Se observa la herida post 24 h en ambas concentraciones. La estadística utilizada fue la prueba de Kruskal Wallis. * Significativo $p \leq 0,05$.

Resumen de resultados obtenidos en migración celular

- Medios condicionados proveniente de células generan mayor migración celular con respecto a las células endoteliales que fueron estimuladas con medios condicionados derivados de células de melanoma en condición estática y laminar a partir de las ocho horas post herida propia del ensayo.
- Medios condicionados con una concentración 0.5x genera similar migración que una concentración 1.0x ya que a partir de las ocho horas post herida comienza a evidenciar diferencias significativas las CE estimuladas con medio condicionado de células de melanomas expuestas a FT tienen una mayor tasa de migración con respecto al resto de los grupos. Esto se puede deber a que en el organismo adulto la migración celular, tiene gran importancia en los procesos homeostáticos como la respuesta inmune y la reparación de tejidos. Sin embargo puede contribuir a algunos procesos patológicos como el cáncer, siendo las células cancerosas en el tejido circundante y la vasculatura un paso inicial en la metástasis tumoral (Stuelten et al., 2018).
- Las CE que fueron estimuladas con medio condicionado proveniente de células de melanoma sometidas a condiciones turbulentas evidencia con una concentración de 0.5x como 1.0x un 60% aproximadamente de migración celular con respecto al resto de los grupos comparados.

Ensayo de formación de tubos para evaluar angiogénesis

Como hemos explicado anteriormente en esta tesis, la necesidad para la progresión del tumor va correlacionada con la generación de una red de vasos sanguíneos anormal, denominada angiogénesis tumoral, la cual permite aportar nutrientes y oxígeno a la masa tumoral altamente proliferativa. A continuación, se mostrará el resultado que se obtuvo al estimular las células endoteliales con medio condicionado proveniente de células de melanoma sometidos en la formación de estructuras tubulares endoteliales, paso inicial para la angiogénesis (Nishida et al., 2006).

El software “Angiogenesis Analyzer” funciona como un programa integrado, es gratuito y de código abierto, fácil de personalizar y compatible con varias plataformas OS (Linux, MacOS y Windows). Esta evaluación *in vitro* de la angiogénesis consiste en la medición de la capacidad de las células endoteliales para formar la estructura conocida como árbol maestro, el cual está compuesto por uniones de células endoteliales y distintos subelementos. Si bien el análisis principal se enfoca en la formación de tubos y mallas, se consideraron los siguientes objetos vectoriales caracterizados por el análisis del software ya que son los principales componentes del árbol maestro:

- **Malla:** Área delimitada por un segmento
- **Área de malla total:** Suma de área de malla en cada imagen
- **Largo de malla:** Suma del tamaño de la malla en cada imagen.
- **Nodo:** Unión de al menos 3 pixel.
- **Uniones:** Grupo de nodos que forma una bifurcación.

Los resultados muestran que las CE estimulada con medio condicionado de células de melanoma expuestas a flujo turbulento (FT) con una concentración 0.5x generan en el ensayo de angiogénesis mayor número de mallas, áreas de la malla y número de nodos (Fig. 12) y (Fig. 13 A, 13 B, y 13 D) ($p= 0,02$). La malla representa la capacidad de generar una estructura tipo vaso cerrada, mientras que el área de malla estaría dándonos un indicativo del área de estos vasos.

Al comparar las CE sometidos con medio condicionado, se podría inferir que las células endoteliales (CE) estimulada con medio condicionado de células de melanoma expuestas a FT generan, un mayor número de vasos sanguíneos y con áreas más grandes para poder suministrar de oxígeno a la masa tumoral. Además, los resultados arrojaron que las células endoteliales sin medio condicionado (SMC) muestran diferencias significativas en todos los vectores analizados con respecto al resto de grupos (E, CE+FL, CE+FT) ($p= 0,05$) y diferencias significativas en: Número de mallas, Área de la malla y número de nodos ($p= 0,01$) (fig.13). Esto muestra claramente que las células endoteliales cuando se cultivan de manera independiente sin algo que simule el ambiente microvascular se comportan de manera anormal con niveles elevados en todos los parámetros observados. Finalmente, en cuanto al número de uniones y largo del tubo no exhibieron diferencias significativas entre células endoteliales sometidos (fig. 13 C, 13 E)

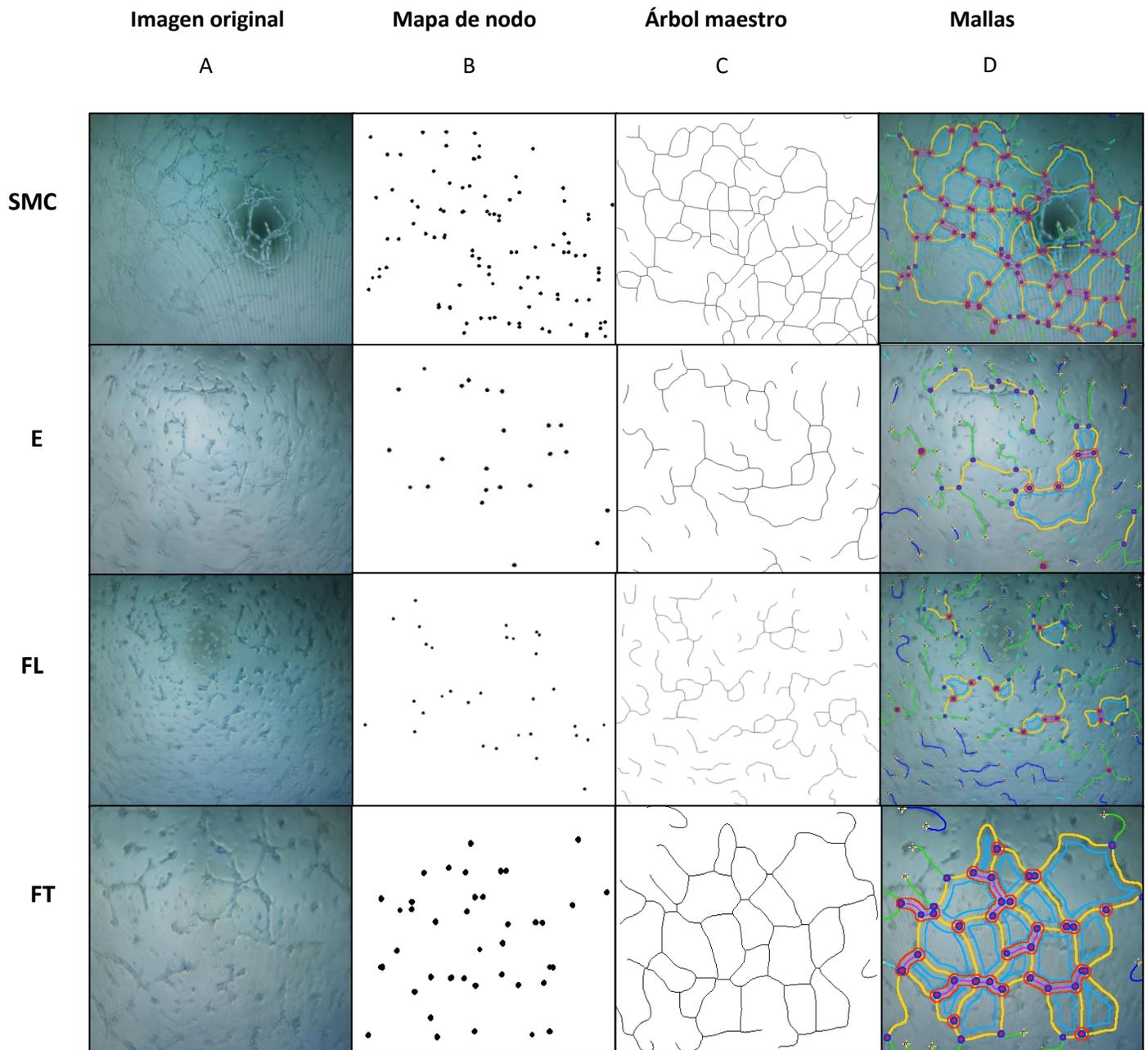


Figura 12. Concentración 0.5x A) En esta figura se encuentran las imágenes reales de cada grupo analizadas en el programa image J. B) Se encuentra el mapa de nodos. C) El árbol maestro o esqueletización de cada grupo. D) Se encuentran las mallas identificando segmentos (color amarillo), malla (color celeste) y nodos (color rojo).

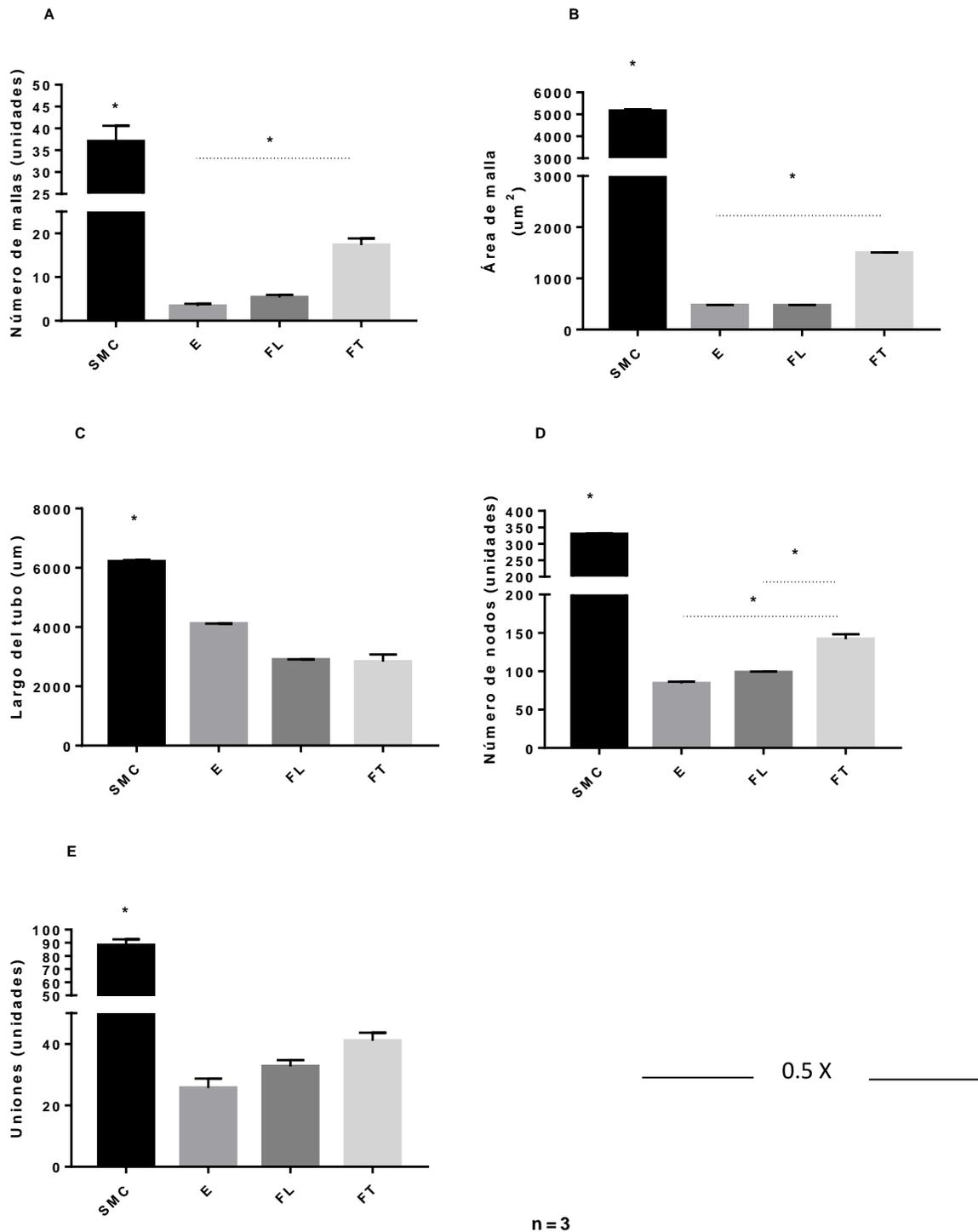


Figura 13. A) Se compararon el número de mallas entre grupos, B) Se comparó el área de la malla, c) Se comparó el largo de los tubos, D) número de nodos y E) número de uniones. La estadística utilizada fue la prueba de Kruskal Wallis. * Significativo $p \leq 0,05$.

Cuando se estimularon a las CE con una concentración de medio condicionado derivado de células de melanoma 1.0x arrojó que las células endoteliales sometidos con flujo turbulento (CE+ FT) presenta diferencias significativas en todos los vectores analizados: Número de mallas, Área de la malla, largo del tubo, número de nodos y número de uniones (Fig. 14 y fig. 15). Aquí podemos destacar que al aumentar la concentración del medio condicionado y las sustancias vasoactivas presentes, la diferencia con respecto a la condición sin medio condicionado es mucho menor en todos los estímulos realizados, esto claramente se debe al aumento en la concentración sustancias vaso activas en el medio de estímulo. Nuevamente al igual que el caso anterior esto nos indica que CE sometidos con medio condicionado de células tumorales expuestas a FT podrían aumentar la angiogénesis debido a que estimula mayor número de vasos sanguíneos y mayor área de estos vasos para poder suministrar de oxígeno a la masa tumoral.

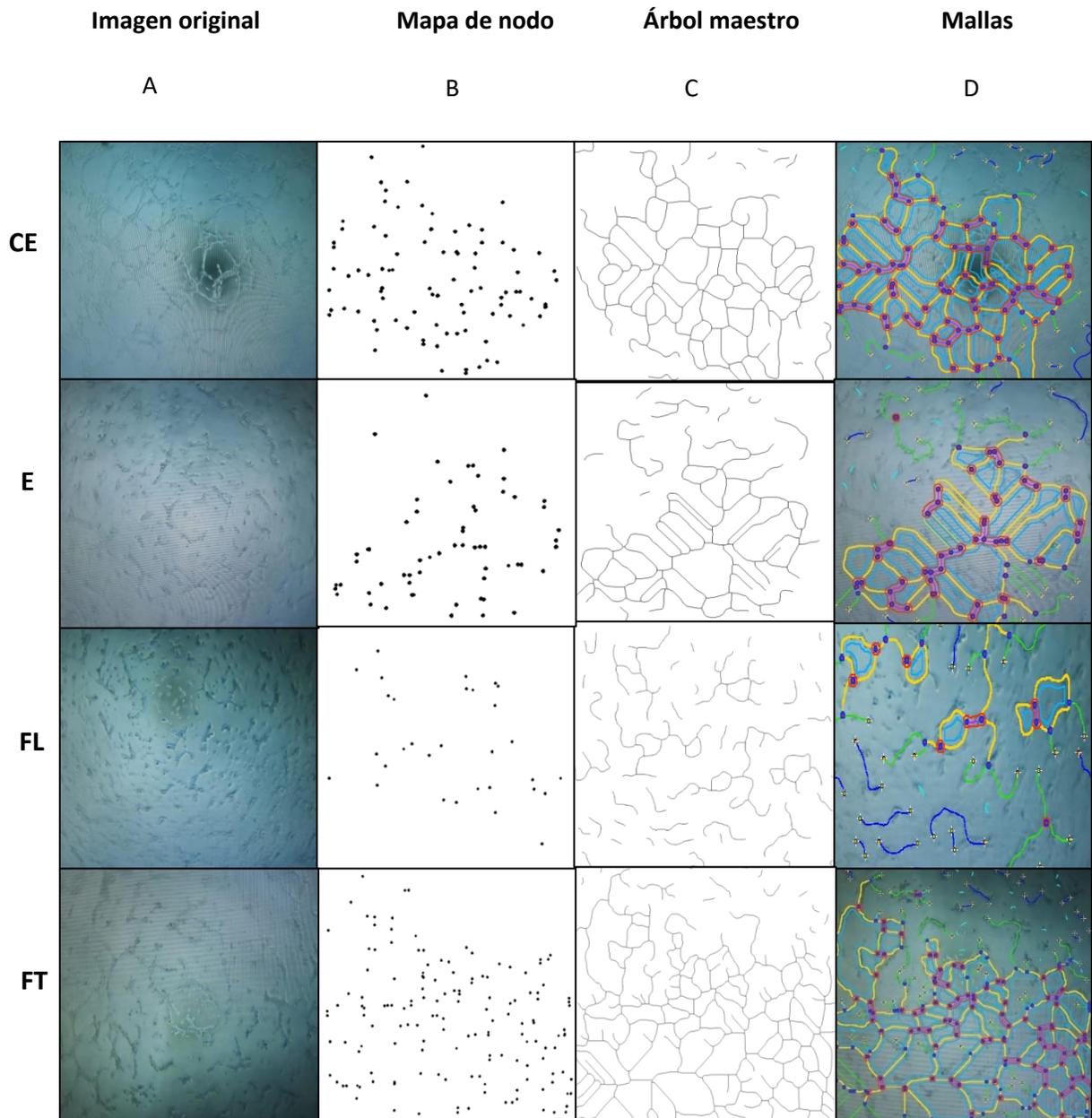


Figura 14. Concentración 1.0x A) En esta figura se encuentran las imágenes reales de cada grupo analizadas en el programa image J. B) Se encuentra el mapa de nodos. C) El árbol maestro o esqueletización de cada grupo. D) Se encuentran las mallas identificando segmentos (color amarillo), malla (color celeste) y nodos (color rojo).

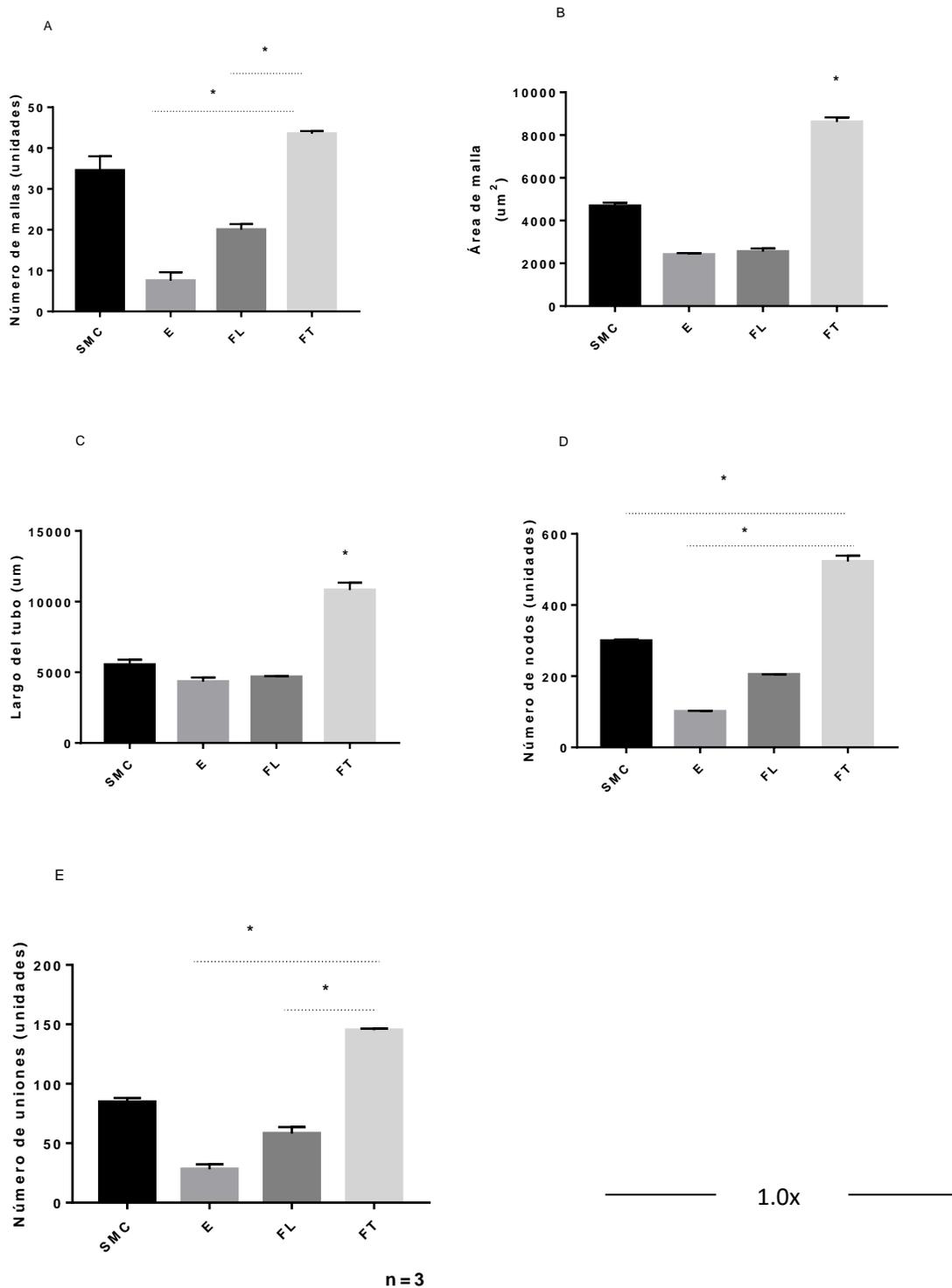


Figura 15. A) Se compararon el número de mallas entre grupos, B) Se comparó el área de la malla, c) Se comparó el largo de los tubos, D) número de nodos y E) número de uniones. La estadística utilizada fue la prueba de Kruskal Wallis. * Significativo $p \leq 0,05$.

Resumen de los resultados obtenido en el ensayo de formación de tubos

- Medios condicionados generan formación de vectores (numero de malls, área de la malla, largo del tubo, números de nodos y números de uniones).
- Medios condicionados con una concentración 1.0x generan mayor formación de vectores (números de mallas, área de las mallas, nodos, entre otros) que una concentración 0.5x.
- CE estimuladas con medio condicionado derivado de células de melanoma que fueron sometidas a estrés turbulento (CE+FT) con una concentración de 1.0x generan un 50% más de números de mallas que las CE estimuladas con medio condicionado derivado de células de melanoma sometida a flujo laminar y un 83% más de número de mallas que la condición estática. La condición CE+FT posee un 45-67% más de áreas que el resto de los grupos comparados, un 50% más de largo de tubo, 20-60% más de número de nodos y uniones.

Discusión

El objetivo inicial de esta investigación era: Determinar si el medio condicionado derivado de células de melanoma sometidas a estrés de roce patológico modifica mecanismos angiogénicos en células endoteliales mediante la inhibición de la señalización mediada por el receptor Tie2. Debido a la contingencia mundial COVID-19, la última parte del objetivo inicial no pudo ser completada quedando como objetivo final de la tesis: Determinar si medio condicionado derivado de células de melanoma sometidas a estrés de roce diferencial patológico modifican mecanismos angiogénicos en células endoteliales. En este sentido cabe señalar que no solo se complejizó el acceso a los laboratorios de cultivo celular, sino que los reactivos tardaron meses en llegar.

Para lograr el objetivo final de esta tesis se construyó un modelo *in vitro* capaz de reproducir las fuerzas dinámicas del flujo sanguíneo. Cabe destacar que en general los experimentos con células del vaso sanguíneo tienden a ser en condiciones estáticas, en esta tesis, se innova intentando generar un ambiente más parecido a lo observado en sistemas biológicos, en el cual las células del vaso sanguíneo están sujetas constantemente a fuerzas físicas generadas por la mecánica circulatoria. El otro aspecto interesante de esta tesis es el hecho que las células de la vasculatura sanguínea no existen solas, sino que hay un microambiente en el que las señales de una célula retroalimentan a las células vecinas, generando respuesta no observadas en modelos de células únicas aisladas. En este sentido la tesis presenta como los estímulos en una célula, melanoma, pueden producir sustancias que son capaces de alterar el fenotipo de otra célula cercana, emulando la comunicación paracrina celular. En este sentido esta tesis intenta ahondar en modelos *in vitro* que imiten de manera un poco más adecuada los fenómenos observados *in vivo*.

Para responder a este objetivo se utilizaron células de melanoma Skmel-37 las cuales fueron sometidas a estrés de roce diferencial en condiciones estática, laminar y turbulento. Luego obtener el medio condicionado del estímulo mecánico diferencial, se cuantificó para estandarizar los volúmenes según concentración de proteínas y

se agregó en dos concentraciones sobre células endoteliales para evaluar como las sustancias derivadas del melanoma son capaces de inducir cambios en los procesos asociados a angiogénesis tales como proliferación, migración y formación de tubos (Dardik et al., 2003)

Las fuerzas físicas del flujo sanguíneo, como el estrés de roce, actúan sobre células que componen el vaso sanguíneo, interactuando con mecanorreceptores y produciendo cambios en el fenotipo celular. En condiciones normales se sabe que el estrés de roce laminar o fisiológico es crucial para el funcionamiento vascular normal, debido a que incluye la regulación del calibre vascular, así como la inhibición de la proliferación, trombosis e inflamación de la pared del vaso, considerándose incluso un estímulo ateroprotector (Banerjee et al., 2003). Por otra parte, el flujo turbulento u oscilatorio, el cual se genera cerca de las bifurcaciones arteriales de las ramas o cuando existen disminuciones abruptas en el calibre vascular están asociados con patologías vasculares crónicas tales como Trombosis, embolia, aterosclerosis y conlleva la formación de ateromas en el lumen vascular (Kühnen et al., 2018). Un ejemplo de células sensibles vasculares al estrés de roce, es el endotelio, que presenta diferentes respuestas conductuales a patrones de flujo alterados tanto a nivel molecular como celular observándose alteraciones a nivel de genotipo y fenotipo. (Kleinstreuer & Zhang, 2003). El flujo turbulento se observa en patologías vasculares crónicas tales como aterosclerosis, hipertensión, y diabetes (Davies et al., 1986).

Si bien el endotelio es el tipo celular que por excelencia interactúa con el estrés de roce sanguíneo, en condiciones patológicas como el cáncer se ha observado que células alteradas pueden también formar parte estructural en el lumen sanguíneo. Sin embargo, aunque es conocido y estudiado los efectos del estrés de roce en células endoteliales, no está claro si pudiese tener algún efecto sobre células cancerígenas formando parte del lumen vascular (Krüger-Genge et al., 2019).

Este trabajo comprobó que las células de cáncer de piel, melanoma, al ser sometidas a condiciones fisiológicas de estrés de roce son capaces de detectarlo e

incluso alterar su citoesqueleto con el fin de alinearse en forma paralela con el ángulo del flujo sanguíneo ya que las células responden a señales químicas y mecánicas presentes en su microambiente (Svitkina, 2018). Varias señales mecánicas son detectadas y transmitidas a las células a través de mecanorreceptores. Estos receptores a menudo entran en contacto con la matriz extracelular (MEC), donde las señales externas se convierten en una respuesta fisiológica (Jang & Beningo, 2019) como muestra la Fig 4.

Uno de los mecanorreceptores que podrían estar involucrados es el cilio primario. El cilio primario son orgánulos basados en microtúbulos que se encuentran en la mayoría de los tipos de células de mamíferos. Varios estudios han demostrado que los cilios primarios se reconocen como orgánulos sensoriales mecánicos y químicos y presentan relevancias en ciertas funciones ciliares como detectar el estrés de roce que conllevan a patologías como la hipertensión, formación de aneurismas (Anvarian et al., 2019). Otro mecanorreceptor celular ubicado en la membrana son las integrinas y receptores acoplados a proteína G y las tirosina quinasa que traducen los estímulos mecánicos del entorno en cambios celulares capaces de recibir y traducir una señal mecánica como el cilio primario mencionado anteriormente en células cancerígenas promoviendo la activación de varias vías de señalización intracelular (RHO, RAC, ERK, PI3K) que controlan la reorganización del citoesqueleto, la generación de fuerza y la anulación de la apoptosis (Auer et al., 2011). Numerosos estudios han demostrado que varios tipos de células cancerosas no pueden expresar cilios, sin embargo, hay células cancerígenas como en la patología adenocarcinoma epitelial humano (HeLa) y células de carcinoma en la piel, las cuales, si presenta cilio primario, aun cuando estos son defectuosos. Esto nos indica que probablemente las células cancerígenas al estar en un estado desdiferenciado son capaces de expresar en su superficie celular mecanorreceptores capaces de responder los estímulos físicos.

Una vez que determinamos que nuestro modelo celular cancerígeno respondía al estrés de roce, se expuso estas células a estímulos físicos diferenciales con el objeto de determinar si un estrés de roce patológico como el turbulento, provocaba

la liberación diferencial de sustancias desde el melanoma. La idea tras este experimento es demostrar que en condiciones de estrés de roce patológico la angiogénesis tumoral pudiese ser más agresiva que en estrés de roce laminar. Este concepto nace de las observaciones clínicas en donde pacientes con patologías crónicas vasculares tienen una mayor propensión a desarrollar metástasis (Pan, 2009).

Si bien existen dos células involucradas en el proceso de angiogénesis el endotelio y el pericito. Por cuestiones de extensión de esta tesis de magister se decidió centrarse en el endotelio. La CE tiene función en el revestimiento interno protector de los vasos como el sitio local para el suministro de oxígeno a todos los tejidos (Hesh et al., 2019). El daño o la disfunción endotelial se considera un iniciador crítico de enfermedades de grandes vasos como la aterosclerosis. Por el contrario, la formación excesiva de nuevos capilares de vasos sanguíneos en forma de angiogénesis se asocia con procesos inflamatorios crónicos, incluidas las enfermedades de los vasos grandes, y de crecimiento tumoral. Por esta razón se ha decidido examinar los efectos del medio condicionado diferencial en procesos esenciales para la angiogénesis como la proliferación, migración y formación de estructuras tubulares en una matriz de proteínas estructurales que asemejan al tejido conectivo (Dabagh & Randles, 2019).

Cabe destacar que la literatura no existe precisión en los volúmenes de medio condicionado utilizados para estimular a otras células, por lo que para evitar diferencias inter-experimentales se decidió primero estandarizar por concentración proteica, para luego utilizar dos concentraciones 0.5x y 1.0x para observar efectos

Las células endoteliales reciben información múltiple de su entorno que finalmente las lleva a progresar a lo largo de todas las etapas del proceso de formación de nuevos vasos. Las señales angiogénicas promueven la proliferación de células endoteliales, aumento de la resistencia a la apoptosis, cambios en el equilibrio proteolítico, reorganización citoesquelética, migración y, finalmente, diferenciación y formación de un nuevo lumen vascular. Por esta razón se evaluará proliferación, migración y angiogénesis celular (Arnaoutova et al., 2009).

Proliferación celular

El primer efecto en las células endoteliales a evaluar fue la proliferación celular. La proliferación de células es un indicador vital para comprender los mecanismos de acción de ciertos genes, proteínas y vías implicadas en la supervivencia o muerte celular tras la exposición a agentes tóxicos.(Cooper, 2000). Hasta la fecha se han desarrollado y utilizado numerosos métodos para evaluar la proliferación de las células, en nuestro caso se utilizó el kit 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU)/ELISA) el cual puede ingresar al ADN y cuantificar el contenido de este en la célula, siendo un indicador del estado S o de Síntesis del ciclo celular (Nowak-Sliwinska et al., 2018).

Los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación celular evidencian, que las células endoteliales que fueron estimuladas con medios condicionados provenientes de las células de melanoma en cualquiera de las condiciones de estrés diferencial generan una disminución en la proliferación celular respecto a una célula deprivada de modo convencional fig. 15. Este fenómeno claramente nos demuestra que cuando se tiene modelos de co-cultivo o células estimuladas con medio condicionado tienden a existir una mayor quiescencia, lo cual es lógico si pensamos en un tejido que normalmente está diferenciado y ejerciendo su labor reguladora del vaso y no en estado proliferativo (Dang et al., 2003). Cuando se omitió el control de células sin medio condicionado observamos que el medio condicionado derivado de estrés de roce turbulento presenta la más baja proliferación de CE en comparación a las que fueron estimuladas con medio condicionado proveniente de células de melanoma que fueron sometida a condición estática y condición laminar. Los resultados hallados son consistentes a la vía de señalización hipotética que se pensaba estudiar originalmente en esta tesis (fig.6) se observa como Ang-2, producida en exceso por la célula de melanoma estimulada con estrés de roce turbulento, inhibe al receptor Tie2, activando la vía de Rho Kinasa la cual conlleva a una estabilización de la unión de hendidura, además de inhibir la vía de AKT disminuyendo la proliferación celular. (Favero et al., 2014)

Migración celular

Una vez que probamos proliferación de las CE estimuladas con medio condicionados procedentes de célula de melanoma quisimos evaluar la migración celular en forma *in vitro*. La migración por parte de las células endoteliales es importante para la formación de nuevos vasos sanguíneos como también para muchos procesos patológicos como la invasión de tumores, la neoangiogénesis y la metástasis (Rajakylä & Vartiainen, 2014).

El ensayo utilizado fue el de cicatrización de heridas. Este ensayo se realiza una herida en el centro del pocillo quedando un área libre de células donde al transcurrir el tiempo las células se volverán a juntar volviendo generar interacción célula-célula (Justus et al., 2014). Cabe destacar que éste ensayo sirve para ver tanto migración como proliferación celular, sin embargo, se decidió realizar dos ensayos específicos para evaluar ambos procesos (Staton et al., 2009). Los resultados de migración celular arrojaron que las CE que fueron estimuladas con medio condicionados provenientes de células de melanoma con estrés de roce turbulento tanto con una concentración de 0.5x como 1.0 mostraron diferencias significativas con respecto al resto de los grupos donde se evidencia aproximadamente un 60% más de migración celular 24 horas luego de realizar la herida. Estos resultados son, similares resultados a los observados por Van Balkom (Van Balkom et al., 2013) en donde células endoteliales sin estímulos, poseen una baja capacidad de migración, esto se puede deber a que hay moléculas extracelulares que inician y promueven la migración como factores de crecimientos como (VEGF), derivados de la célula de melanoma. Se sabe que estos factores de crecimiento aumentan la tasa y la direccionalidad celular que conduce a una migración celular persistente y dirigida (Zhang et al., 2012). Otra posible causa de esta migración por parte de las células endoteliales que son estimuladas con medios condicionados provenientes de una condición turbulenta son los pericitos. Los pericitos son células murales que envuelven a la célula endotelial (Fuxe et al., 2011) con el fin de regular el flujo vascular y la permeabilidad de las células endoteliales (Chatterjee & Naik, 2012). Los pericitos son capaces de secretar Ang 1 y Ang 2, con las cuales es capaz de

regular la estabilidad del vaso sanguíneo. Como se mencionó anteriormente en este escrito, Ang-1 estabiliza los vasos sanguíneos, generalmente luego de un proceso migratorio, mientras que Ang-2 antagoniza esta función. Estudios han demostrado que sustancia pro-migratorias y pro-angiogénicas como VEGF y Ang 2 eliminan la cobertura de los pericitos alejándolos del vaso sanguíneo inhibiendo de esta manera la vía Rhoa Kinasa la cual estimula la reorganización del citoesqueleto de F-actina y la adhesión de la matriz celular jugando un papel crucial en la migración de las células endoteliales (CE) en la angiogénesis y la reparación de lesiones a lo largo del endotelio (Fig.6). En ese sentido nuestros resultados de migración se condicen con una estimulación mediada por Ang-2 la cual induciría un aumento en la migración celular (Fig.11) (Bryan et al., 2010). Aun cuando nuevos estudios señalan que la migración celular por parte de las células endoteliales no está relacionada con los pericitos como se pensaba a fines del año 2010, ya que se ha demostrado que estas células pueden moverse por los vasos sanguíneos de forma libre e independiente no siendo una célula estática como se pensaba, observándose que había células que migraban sin ver pericitos en el vaso sanguíneo (Dewi et al., 2018). Sin embargo esta teoría ha perdido sustento ya que es probable que la interacción potencial entre las CE y los pericitos se produzca a través del intercambio de señales paracrinas y no por contacto directo. Esto se debe a que las células pericitos no han sido tan estudiadas como las células endoteliales quedando reflejado que solo en la base de pubmed encontramos 118 veces más artículos que hablen del endotelio con respecto a artículos que mencionen a la célula pericitos.

Angiogénesis

Finalmente nos interesó observar el efecto que genera las sustancias vasoactivas liberadas por las células de melanoma vertiéndola a las CE y ver el efecto en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros pre-existentes. En este proceso las células endoteliales son los principales artífices. El proceso de la

angiogénesis está bien regulado por moléculas activadoras e inhibitoras de este proceso como por ejemplo algunos factores de crecimiento ya anteriormente mencionados como VEGF o proteínas comunes como angiotensina II. (Sánchez Socarrás, 2001).

Por esta razón en ensayo que utilizamos para evaluar angiogénesis es automatizado y confiable, el cual identifica los tubos angiogénicos formados por células endoteliales y proporciona mediciones cuantitativas relacionadas con la formación del tubo angiogénico, como el número de tubos, área y longitud de los tubos y ramificaciones de forma *in vitro* (Irvin et al., 2014).

Han pasado más de 20 años desde que se demostró por primera vez que las células endoteliales formarán rápidamente estructuras capilares *in vitro* cuando se coloquen sobre una matriz extracelular de la membrana basal reconstituida (Arnaoutova et al., 2009), esto se demuestra en la figura 12 A y 14 A. Sin embargo, en nuestra investigación quisimos saber el comportamiento que presentan las células endoteliales cuando son estimuladas con medio condicionado proveniente de células de melanoma simulando la angiogénesis tumoral. Los resultados de nuestra investigación arrojaron que las células endoteliales que fueron estimulada con medio condicionado proveniente de las células de melanoma sometida a estrés de roce diferencial en condiciones turbulencia mostraron mayor cantidad de número de tubos formados, longitud y área de los tubos además de mayores números de nodos, los cuales representan bifurcaciones lo que estaría mostrando que existe mayor estimulación de la angiogénesis tumoral. Si bien todos los parámetros de vectores angiogénicos están aumentados, cabe destacar que el área de la malla es mayor con respecto al estímulo laminar. Esto nos podría indicar que si bien hay una mayor formación de vasos, estos al parecer son más anchos, lo cual pareciera indicar un fenómeno de malformación angiogénica.

La angiopoyetina-2 se identificó inicialmente por actuar como un antagonista de la angiopoyetina-1 (Ang-1) a través de la señalización a través de Tie2 (receptor expresado principalmente por células endoteliales), que es relevante para la maduración y estabilización de los vasos sanguíneos (Yuan et al., 2009). Mientras

que Ang-1 promueve la estabilización de los vasos promoviendo la quiescencia de las células endoteliales y actuando sobre el reclutamiento de pericitos y células de músculo liso, Ang-2 desestabiliza esta vía y favorece la angiogénesis junto con otras moléculas inductoras como VEGF (Hashizume et al., 2010). En una investigación similar a esta tesis se evaluó la vía de señalización que se genera en la célula endotelial luego de ser estimulada con medio condicionado proveniente de la célula de melanoma que fue sometida a estrés de roce, y se observó que se activa la vía de AKT, la cual se encuentra sobreexpresada, y ERK la cual estaba disminuida en la célula endotelial luego del estímulo. (Cardoso, A.C. Tese de Doutorado, 2018) Esto podría explicar la mayor formación de tubos, longitud, nodos, área de las mallas, ya que en el caso de la proteína AKT ésta juega un rol importante en la supervivencia y angiogénesis de la célula endotelial (Somanath et al., 2006), mientras que la inhibición de ERK ha mostrado generar mayor formación de tubos por parte de las células endoteliales (Murphy et al., 2006).

Los pericitos ya mencionados anteriormente se cree que regulan el diámetro capilar e influyen físicamente en el comportamiento de la CE promoviendo la brotación capilar fisiológica, por lo que si bien no fue nuestra intención en esta tesis estudiar las células pericitos podrían generar nuevos conocimientos respecto a la angiogénesis del vaso sanguíneo ya que como se dijo anteriormente hay muchas preguntas que se están generando como ¿Existen subtipos específicos de pericitos? ¿Los pericitos cambian su fenotipo para realizar funciones específicas como la angiogénesis o migración celular? (Stapor et al., 2014)

Si bien nuestros hallazgos han confirmado resultados de otras investigaciones en cuanto a proliferación, migración y angiogénesis en forma *in vitro*. No concuerdan con los resultados que han mostrado modelos bioinformáticos que pueden predecir estos mismos hechos como el reporte de Norton y Popel (2016), quienes mostraron que aquellas células con alta tasa de proliferación generan bajas cantidades de bifurcaciones y a su vez mayor angiogénesis. Este estudio informático también mostró que a mayor proliferación existe menor angiogénesis ya que los vasos sanguíneos se atrofian y no llenan espacios. Sin embargo, este modelo

bioinformático no estudió precisamente la interacción entre sustancias vasoactivas liberadas por células de melanoma expuesta a diferentes estímulos como fue en nuestro caso. Por lo que se podría comenzar a realizar experimentos bioinformáticos de co-cultivos y de esta manera minimizar errores.

Limitaciones del estudio

Cabe señalar que este estudio no está exento de limitaciones. En esta investigación no se alcanzó a evaluar la vía Ang-2 y su receptor Tie2 **debido al conflicto social propio del país y a la pandemia mundial de Covid-19.**

Otra limitación es que si bien el modelo de placas *in vitro* se considera lo más cercano a la realidad para la aplicación de estrés de roce en células melanoma tiene algunos problemas técnicos como la diferencia en las magnitudes de roce a las células están expuestas a lo largo del eje de la placa (Rodríguez-Núñez et al., 2015). Es decir, que existe diferencia entre las células que se encuentran en el centro de la placa con respecto a las que se ubican en la región del borde no recibiendo necesariamente el mismo estrés mecánico por lo que no todas las células necesariamente liberar la misma cantidad y sustancias vasoactivas. Actualmente no existe consenso en la literatura sobre cuáles son los modelos más robustos para reproducir el estrés de roce en las células tumorales en forma *in vitro* que puedan ser reproducibles *in vivo*. Actualmente se ha comenzado a realizar estudios bioinformáticos para dar mayor claridad a estos procesos sin caer en sesgos (Ghim et al., 2018). Otra limitación fue el hecho que no se comprobó que nuestro candidato Ang 2 era en parte responsable de los fenómenos observados a nivel del comportamiento del endotelio.

Conclusiones

De acuerdo con nuestros resultados obtenidos en esta investigación se puede concluir que las células de melanoma son sensibles al estrés de roce diferencial debido que liberaron sustancias vasoactivas cuando fueron sometidas a diferentes condiciones: estática, laminar y turbulento obteniendo así medios condicionados. Una vez que se obtuvieron estos medios condicionados se estimularon a las células endoteliales evidenciando diferentes resultados en los ensayos de proliferación, migración y angiogénesis. Las células endoteliales que fueron estimuladas con medio condicionado proveniente de células de melanoma en condiciones turbulentas exhibieron baja proliferación celular, sin embargo, mostraron una mayor tasa de migración y formación de vectores (número de mallas, área de la malla, largo del tubo, números de nodos y números de uniones) con respecto a las células endoteliales que fueron estimuladas con medio condicionado en condición estático y laminar. De esta manera se ha podido explorar de manera *in vitro* la respuesta angiogénica de las células endoteliales cuando son señalizadas por el tumor. Finalmente señalar que el objetivo del estudio a nivel macro era demostrar que el flujo turbulento, el cual se observa en condiciones patológicas vasculares crónicas, induce la liberación de sustancia vasoactivas desde células cancerígena, como el melanoma, y que conlleva finalmente a procesos angiogenicos patológicos en comparación a lo observando al estar bajo un microambiente de flujo laminar (sano). Por ende, alteración en el estrés de roce en personas con patologías vasculares crónicas, podría inducir una condición sensible con respecto al desarrollo de canceres que sean capaces de interactuar con las fuerzas hemodinámicas sanguíneas.

Proyección

Finalmente señalar que se estudiarán a futuro la vía de señalización mediada por Ang 2 como una de las posibles señales responsables de los resultados observados en la tesis.

Referencias

- Akwii, R. G., Sajib, M. S., Zahra, F. T., & Mikelis, C. M. (2019). Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/cells8050471>
- Anvarian, Z., Mykytyn, K., Mukhopadhyay, S., Pedersen, L. B., & Christensen, S. T. (2019). Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nature Reviews. Nephrology*, 15(4), 199–219. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0116-9>
- Apalla, Z., Lallas, A., Sotiriou, E., Lazaridou, E., & Ioannides, D. (2017). Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatology Practical & Conceptual*, 7(2), 1–6. <https://doi.org/10.5826/dpc.0702a01>
- Arango Prado, M. del C., & Rodríguez-Padilla, C. (2016). Protagonismo del sistema inmune en el microambiente de los tumores malignos de la mama. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(2), 0–0.
- Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H. K., & Benton, G. (2009). The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: State of the science and the art. *Angiogenesis*, 12(3), 267–274. <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9146-4>
- Auer, M., Hausott, B., & Klimaschewski, L. (2011). Rho GTPases as regulators of morphological neuroplasticity. *Annals of Anatomy*, 193(4), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.02.015>
- Banerjee, R. K., Back, L. H., Back, M. R., & Cho, Y. I. (2003). Physiological flow analysis in significant human coronary artery stenoses. *Biorheology*, 40(4), 451–476.
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(12), 786–801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>

- Bryan, B. A., Dennstedt, E., Mitchell, D. C., Walshe, T. E., Noma, K., Loureiro, R., Saint-Geniez, M., Campaigniac, J.-P., Liao, J. K., & D'Amore, P. A. (2010). RhoA/ROCK signaling is essential for multiple aspects of VEGF-mediated angiogenesis. *The FASEB Journal*, 24(9), 3186–3195. <https://doi.org/10.1096/fj.09-145102>
- Buchanan, C. F., Verbridge, S. S., Vlachos, P. P., & Rylander, M. N. (2014). Flow shear stress regulates endothelial barrier function and expression of angiogenic factors in a 3D microfluidic tumor vascular model. *Cell Adhesion & Migration*, 8(5), 517–524. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.970001>
- Cardoso Tese de Doutorado (2018) Facultad de Medicina Oncología: Biblioteca digital USP. Recuperado de: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5155/tde-20032019-152640/pt-br.php>
- Casariego, Z. J., & Baudo, J. E. (2004). Trabajo de revisión: Melanoma. *Avances En Periodoncia e Implantología Oral*, 16(3), 157–177.
- Castañeda Gameros, P., & Eljure Téllez, J. (2016). El cáncer de piel, un problema actual. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 59(2), 6–14.
- Chang, Y. S., di Tomaso, E., McDonald, D. M., Jones, R., Jain, R. K., & Munn, L. L. (2000). Mosaic blood vessels in tumors: Frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), 14608–14613. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14608>
- Chatterjee, S., & Naik, U. P. (2012). Pericyte-endothelial cell interaction. *Cell Adhesion & Migration*, 6(3), 157–159. <https://doi.org/10.4161/cam.20252>
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2017). Effects of shear stress on endothelial cells: Go with the flow. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 219(2), 382–408. <https://doi.org/10.1111/apha.12725>
- Chong, D. C., Yu, Z., Brighton, H. E., Bear, J. E., & Bautch, V. L. (2017). Tortuous Microvessels Contribute to Wound Healing via Sprouting Angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(10), 1903–1912. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309993>

Ciancaglini, C. (2004). Hidrodinamia de la circulación vascular periférica normal y patológica. *Revista Costarricense de Cardiología*, 6(2), 43–61.

Cooper, G. M. (2000). The Development and Causes of Cancer. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>

Dabagh, M., & Randles, A. (2019). Role of deformable cancer cells on wall shear stress-associated-VEGF secretion by endothelium in microvasculature. *PLoS ONE*, 14(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211418>

Dang, C., Gilewski, T. A., Surbone, A., & Norton, L. (2003). Cell Proliferation. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12640/>

Dardik, A., Yamashita, A., Aziz, F., Paszkowiak, J., Asada, H., & Sumpio, B. E. (2003). Shear stress stimulated endothelial cell derived PDGF and IL-1 alpha both stimulate SMC chemotaxis via the MAPK pathway. *Journal of Surgical Research*, 114(2), 249. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2003.08.159>

Davies, P. F., Remuzzi, A., Gordon, E. J., Dewey, C. F., & Gimbrone, M. A. (1986). Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(7), 2114–2117.

DeCicco-Skinner, K. L., Henry, G. H., Cataisson, C., Tabib, T., Gwilliam, J. C., Watson, N. J., Bullwinkle, E. M., Falkenburg, L., O'Neill, R. C., Morin, A., & Wiest, J. S. (2014). Endothelial Cell Tube Formation Assay for the In Vitro Study of Angiogenesis. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 91. <https://doi.org/10.3791/51312>

Dela Paz, N. G., & D'Amore, P. A. (2009). Arterial versus venous endothelial cells. *Cell and Tissue Research*, 335(1), 5–16. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0706-5>

Dewi, N. A., Aulanni'am, A., Sujuti, H., Widodo, M. A., & Soeatmadji, D. W. (2018). Mechanism of retinal pericyte migration through Angiopoietin/Tie-2 signaling pathway on diabetic rats. *International Journal of Ophthalmology*, 11(3), 375–381. <https://doi.org/10.18240/ijo.2018.03.05>

- Dinnes, J., Deeks, J. J., Chuchu, N., Matin, R. N., Wong, K. Y., Aldridge, R. B., Durack, A., Gulati, A., Chan, S. A., Johnston, L., Bayliss, S. E., Leonardi-Bee, J., Takwoingi, Y., Davenport, C., O'Sullivan, C., Tehrani, H., & Williams, H. C. (2018). Visual inspection and dermoscopy, alone or in combination, for diagnosing keratinocyte skin cancers in adults. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018(12). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011901.pub2>
- Donnem, T., Hu, J., Ferguson, M., Adighibe, O., Snell, C., Harris, A. L., Gatter, K. C., & Pezzella, F. (2013). Vessel co-option in primary human tumors and metastases: An obstacle to effective anti-angiogenic treatment? *Cancer Medicine*, 2(4), 427–436. <https://doi.org/10.1002/cam4.105>
- Dudley, A. C. (2012). Tumor Endothelial Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006536>
- Favero, G., Paganelli, C., Buffoli, B., Rodella, L. F., & Rezzani, R. (2014). Endothelium and Its Alterations in Cardiovascular Diseases: Life Style Intervention. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/801896>
- Felcht, M., Luck, R., Schering, A., Seidel, P., Srivastava, K., Hu, J., Bartol, A., Kienast, Y., Vettel, C., Loos, E. K., Kutschera, S., Bartels, S., Appak, S., Besemfelder, E., Terhardt, D., Chavakis, E., Wieland, T., Klein, C., Thomas, M., ... Augustin, H. G. (2012). Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(6), 1991–2005. <https://doi.org/10.1172/JCI58832>
- Fernández-Cortés, M., Delgado-Bellido, D., & Oliver, F. J. (2019). Vasculogenic Mimicry: Become an Endothelial Cell “But Not So Much.” *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00803>
- Fuxe, J., Tabruyn, S., Colton, K., Zaid, H., Adams, A., Baluk, P., Lashnits, E., Morisada, T., Le, T., O'Brien, S., Epstein, D. M., Koh, G. Y., & McDonald, D. M. (2011). Pericyte Requirement for Anti-Leak Action of Angiopoietin-1 and Vascular Remodeling in Sustained Inflammation. *The American Journal of Pathology*, 178(6), 2897–2909. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.008>
- Gallo, L. H., Ko, J., & Donoghue, D. J. (2017). The importance of regulatory ubiquitination in cancer and metastasis. *Cell Cycle*, 16(7), 634–648. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1288326>

- Ghim, M., Pang, K. T., Arshad, M., Wang, X., & Weinberg, P. D. (2018). A novel method for segmenting growth of cells in sheared endothelial culture reveals the secretion of an anti-inflammatory mediator. *Journal of Biological Engineering*, 12(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13036-018-0107-6>
- Giles, W. B. (1999). Vascular Doppler techniques. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 26(4), 595–606, vi. [https://doi.org/10.1016/s0889-8545\(05\)70101-7](https://doi.org/10.1016/s0889-8545(05)70101-7)
- Gimbrone, M. A., Topper, J. N., Nagel, T., Anderson, K. R., & Garcia-Cardena, G. (2000). Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 902, 230–239; discussion 239–240. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06318.x>
- Gu, H., Li, Y., Fok, H., Simpson, J., Kentish, J. C., Shah, A. M., & Chowienczyk, P. J. (2017). Reduced First-Phase Ejection Fraction and Sustained Myocardial Wall Stress in Hypertensive Patients With Diastolic Dysfunction: A Manifestation of Impaired Shortening Deactivation That Links Systolic to Diastolic Dysfunction and Preserves Systolic Ejection Fraction. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 69(4), 633–640. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08545>
- Hahn, C., & Schwartz, M. A. (2009). Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(1), 53–62. <https://doi.org/10.1038/nrm2596>
- Hashizume, H., Falcón, B. L., Kuroda, T., Baluk, P., Coxon, A., Yu, D., Bready, J. V., Oliner, J. D., & McDonald, D. M. (2010). Complementary Actions of Inhibitors of Angiopoietin-2 and VEGF on Tumor Angiogenesis and Growth. *Cancer Research*, 70(6), 2213–2223. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1977>
- Hesh, C. A., Qiu, Y., & Lam, W. A. (2019). Vascularized Microfluidics and the Blood–Endothelium Interface. *Micromachines*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/mi11010018>
- Holmes, D. I., & Zachary, I. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: Angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology*, 6(2), 209. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-2-209>

- Huang, Q., Hu, X., He, W., Zhao, Y., Hao, S., Wu, Q., Li, S., Zhang, S., & Shi, M. (2018). Fluid shear stress and tumor metastasis. *American Journal of Cancer Research*, 8(5), 763–777.
- Irvin, M. W., Zijlstra, A., Wikswo, J. P., & Pozzi, A. (2014). Techniques and assays for the study of angiogenesis. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 239(11), 1476–1488. <https://doi.org/10.1177/1535370214529386>
- Jang, I., & Beningo, K. A. (2019). Integrins, CAFs and Mechanical Forces in the Progression of Cancer. *Cancers*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/cancers11050721>
- Jo, H., Dull, R. O., Hollis, T. M., & Tarbell, J. M. (1991). Endothelial albumin permeability is shear dependent, time dependent, and reversible. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 260(6 29-6), H1992–H1996.
- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 88. <https://doi.org/10.3791/51046>
- Kaminsky, D. A. (2012). What Does Airway Resistance Tell Us About Lung Function? *Respiratory Care*, 57(1), 85–99. <https://doi.org/10.4187/respcare.01411>
- Kämmerer, P. W., Thiem, D. G. E., Alshihri, A., Wittstock, G. H., Bader, R., Al-Nawas, B., & Klein, M. O. (2017). Cellular fluid shear stress on implant surfaces—Establishment of a novel experimental set up. *International Journal of Implant Dentistry*, 3. <https://doi.org/10.1186/s40729-017-0085-3>
- Kleinstreuer, C., & Zhang, Z. (2003). Laminar-to-turbulent fluid-particle flows in a human airway model. *International Journal of Multiphase Flow*, 29(2), 271–289. [https://doi.org/10.1016/S0301-9322\(02\)00131-3](https://doi.org/10.1016/S0301-9322(02)00131-3)
- Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R.-P., & Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>

- Kühnen, J., Scarselli, D., Schaner, M., & Hof, B. (2018). Relaminarization by Steady Modification of the Streamwise Velocity Profile in a Pipe. *Flow, Turbulence and Combustion*, 100(4), 919–943. <https://doi.org/10.1007/s10494-018-9896-4>
- Kurzyk, A. (2015). [Angiogenesis—Possibilities, problems and perspectives]. *Postepy Biochemii*, 61(1), 25–34.
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117–1134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>
- Letelier, R. (2007). La angiogénesis y el cáncer. *Medwave*, 7(03). <https://doi.org/10.5867/medwave.2007.03.3546>
- Liang, S., Slattery, M. J., & Dong, C. (2005). Shear stress and shear rate differentially affect the multi-step process of leukocyte-facilitated melanoma adhesion. *Experimental Cell Research*, 310(2), 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.07.028>
- Lima, M. M., Rosa, F. J., Marín, A., & Romero-Vecchione, E. (2009). El sistema cardiovascular. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 7(3), 3–9.
- Loh, Y. C., Tan, C. S., Ch'ng, Y. S., Yeap, Z. Q., Ng, C. H., & Yam, M. F. (2018). Overview of the Microenvironment of Vasculature in Vascular Tone Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010120>
- Lukasz, A., Kümpers, P., & David, S. (2012). Role of Angiopoietin/Tie2 in Critical Illness: Promising Biomarker, Disease Mediator, and Therapeutic Target? *Scientifica*, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/160174>
- Maghnie, M., Genovese, E., Sommaruga, M. G., Aricò, M., Locatelli, D., Arbustini, E., Pezzotta, S., & Severi, F. (1998). Evolution of childhood central diabetes insipidus into panhypopituitarism with a large hypothalamic mass: Is “lymphocytic infundibuloneurohypophysitis” in children a different entity? *European Journal of Endocrinology*, 139(6), 635–640. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1390635>

- Majed, B. H., & Khalil, R. A. (2012). Molecular Mechanisms Regulating the Vascular Prostacyclin Pathways and Their Adaptation during Pregnancy and in the Newborn. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 540–582. <https://doi.org/10.1124/pr.111.004770>
- Matson, J. P., & Cook, J. G. (2017). Cell cycle proliferation decisions: The impact of single cell analyses. *The FEBS Journal*, 284(3), 362–375. <https://doi.org/10.1111/febs.13898>
- Mazurek, R., Dave, J. M., Chandran, R. R., Misra, A., Sheikh, A. Q., & Greif, D. M. (2017). Vascular cells in blood vessel wall development and disease. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 78, 323–350. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.08.001>
- Mentzer, S. J., & Konerding, M. A. (2014). Intussusceptive Angiogenesis: Expansion and Remodeling of Microvascular Networks. *Angiogenesis*, 17(3), 499–509. <https://doi.org/10.1007/s10456-014-9428-3>
- Montorfano, M. A., Pla, F., Vera, L., Cardillo, O., Nigra, S. G., & Montorfano, L. M. (2017). Point-of-care ultrasound and Doppler ultrasound evaluation of vascular injuries in penetrating and blunt trauma. *Critical Ultrasound Journal*, 9. <https://doi.org/10.1186/s13089-017-0060-5>
- Murphy, D. A., Makonnen, S., Lassoued, W., Feldman, M. D., Carter, C., & Lee, W. M. F. (2006). Inhibition of Tumor Endothelial ERK Activation, Angiogenesis, and Tumor Growth by Sorafenib (BAY43-9006). *The American Journal of Pathology*, 169(5), 1875–1885. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050711>
- Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., & Azab, A. K. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia*, 3, 83–92. <https://doi.org/10.2147/HP.S93413>
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in Cancer. *Vascular Health and Risk Management*, 2(3), 213–219.
- Norton, K.-A., & Popel, A. S. (2016). Effects of endothelial cell proliferation and migration rates in a computational model of sprouting angiogenesis. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep36992>

- Nowak-Sliwinska, P., Alitalo, K., Allen, E., Anisimov, A., Aplin, A. C., Auerbach, R., Augustin, H. G., Bates, D. O., van Beijnum, J. R., Bender, R. H. F., Bergers, G., Bikfalvi, A., Bischoff, J., Böck, B. C., Brooks, P. C., Bussolino, F., Cakir, B., Carmeliet, P., Castranova, D., ... Griffioen, A. W. (2018). Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*, 21(3), 425–532. <https://doi.org/10.1007/s10456-018-9613-x>
- Pan, S. (2009). Molecular Mechanisms Responsible for the Atheroprotective Effects of Laminar Shear Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(7), 1669–1682. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2487>
- Pastushenko, I., Vermeulen, P. B., Van den Eynden, G. G., Rutten, A., Carapeto, F. J., Dirix, L. Y., & Van Laere, S. (2014). Mechanisms of tumour vascularization in cutaneous malignant melanoma: Clinical implications. *The British Journal of Dermatology*, 171(2), 220–233. <https://doi.org/10.1111/bjd.12973>
- Prager, G. W., Poettler, M., Unseld, M., & Zielinski, C. C. (2012). Angiogenesis in cancer: Anti-VEGF escape mechanisms. *Translational Lung Cancer Research*, 1(1), 14–25. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2011.11.02>
- Rajakylä, E. K., & Vartiainen, M. K. (2014). Rho, nuclear actin, and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *Small GTPases*, 5. <https://doi.org/10.4161/sgtp.27539>
- Rodríguez-Núñez, I., Romero, F., González, M., & Campos, R. R. (2015). Biología del Desarrollo Vascular: Mecanismos en Condiciones Fisiológicas y Estrés Flujo. *International Journal of Morphology*, 33(4), 1348–1354. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022015000400026>
- Sample, A., & He, Y.-Y. (2018). Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 34(1), 13–24. <https://doi.org/10.1111/phpp.12329>
- Sánchez Socarrás, V. (2001). Papel de la Angiogénesis en el crecimiento tumoral. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 20(3), 223–230.
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., & Longacre, M. (2013). Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic

Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 21087–21113.
<https://doi.org/10.3390/ijms141021087>

Sever, R., & Brugge, J. S. (2015). Signal Transduction in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006098>

Somanath, P. R., Razorenova, O. V., Chen, J., & Byzova, T. V. (2006). Akt1 in Endothelial Cell and Angiogenesis. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(5), 512–518.

Song, S.-H., Kim, K. L., Lee, K.-A., & Suh, W. (2012). Tie1 regulates the Tie2 agonistic role of angiopoietin-2 in human lymphatic endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419(2), 281–286.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.009>

Stapor, P. C., Sweat, R. S., Dashti, D. C., Betancourt, A. M., & Murfee, W. L. (2014). Pericyte Dynamics during Angiogenesis: New Insights from New Identities. *Journal of Vascular Research*, 51(3), 163–174.
<https://doi.org/10.1159/000362276>

Staton, C. A., Reed, M. W. R., & Brown, N. J. (2009). A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(3), 195–221. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00633.x>

Stuelten, C. H., Parent, C. A., & Montell, D. J. (2018). Cell motility in cancer invasion and metastasis: Insights from simple model organisms. *Nature Reviews. Cancer*, 18(5), 296–312. <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.15>

Svitkina, T. (2018). The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(1).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018267>

Thurston, G., & Daly, C. (2012). The Complex Role of Angiopoietin-2 in the Angiopoietin–Tie Signaling Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006650>

- Trotter, S. C., Sroa, N., Winkelmann, R. R., Olencki, T., & Bechtel, M. (2013). A Global Review of Melanoma Follow-up Guidelines. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 6(9), 18–26.
- Van Balkom, B. W. M., de Jong, O. G., Smits, M., Brummelman, J., den Ouden, K., de Bree, P. M., van Eijndhoven, M. A. J., Pegtel, D. M., Stoorvogel, W., Würdinger, T., & Verhaar, M. C. (2013). Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells. *Blood*, 121(19), 3997–4006, S1-15. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-478925>
- Yuan, H. T., Khankin, E. V., Karumanchi, S. A., & Parikh, S. M. (2009). Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Molecular and Cellular Biology*, 29(8), 2011–2022. <https://doi.org/10.1128/MCB.01472-08>
- Zhang, L., Wang, J.-N., Tang, J.-M., Kong, X., Yang, J.-Y., Zheng, F., Guo, L.-Y., Huang, Y.-Z., Zhang, L., Tian, L., Cao, S.-F., Tuo, C.-H., Guo, H.-L., & Chen, S.-Y. (2012). VEGF is essential for the growth and migration of human hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Biology Reports*, 39(5), 5085–5093. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1304-2>