

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas  
Área Biología - Subárea Bioquímica  
PEDECIBA – Universidad de la República

EFFECTO DE LA HIPERPOLARIZACIÓN DEL POTENCIAL DE  
MEMBRANA PLASMÁTICA SOBRE LA ANGIOGÉNESIS Y LA  
PROGRESIÓN TUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO*

**Lucía Fajardo Martínez**

Orientador: Dra. Silvia Chifflet

Co-orientador: Dra. Patricia Lagos

Laboratorio de Bioquímica Celular, Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina, Universidad de la República  
Montevideo, Uruguay

Mayo 2018

## **Agradecimientos**

A Silvia, gracias por su apoyo, compromiso, dedicación y por contribuir en mi formación académica y personal

A Patricia por su dedicación y apoyo anímico e intelectual

A Julio por su disponibilidad en comentarios y asesoramiento

A mis compañeros de laboratorio por su paciencia y disponibilidad para guiarme, aconsejarme y enseñarme en cada paso

A Frances por su ayuda con el modelo de desarrollo de melanomas en el ratón y gracias también por su ayuda y apoyo cotidiano

Al tribunal por haber aceptado corregir la presente tesis

Al frigorífico Las Piedras que amablemente nos brindó las aortas de bovino para realizar este trabajo

A las Avícolas ALA y Prodhin por brindarnos los huevos embrionados utilizados en este trabajo

Al Dr. Alejandro Chabalgoity por amablemente cedernos las células B16F1

A Dilave por brindarnos los ratones y a la URBE su apoyo en el mantenimiento

A mi familia y amigos

A Proyecto de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, 2009 y proyecto CSIC Grupos I+D, 2014

# Contenido

<b>Título .....</b>	<b>1</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>2</b>
<b>Tabla de contenidos .....</b>	<b>3</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>6</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>7</b>
<b>I      <b>Introducción</b></b>	<b>9</b>
I.1      Epitelios .....	9
I.2      Uniones celulares en epitelios .....	10
I.3      El citoesqueleto de actina en epitelios .....	12
I.4      Uniones celulares y cáncer .....	13
I.5      Potencial de membrana plasmática y citoesqueleto en epitelios .....	14
I.6      Potencial de membrana plasmática y cáncer .....	15
I.7      Angiogénesis .....	18
I.8      Progresión tumoral .....	19
<b>II     <b>Hipótesis y Objetivos</b></b>	<b>20</b>
<b>III    <b>Metodología</b></b>	<b>21</b>
III.1    Soluciones y reactivos .....	21
III.2    Cultivos de células, huevos embrionados y ratones .....	21
III.3    Determinación de cambios en el potencial de membrana plasmática .....	23
III.4    Microscopía de fluorescencia .....	23
III.5    Extendidos de endotelio de aorta .....	24
III.6    Estrategia experimental para el estudio de la estabilidad de las uniones celulares y de la migración, proliferación e inducción de ‘sprouting’ experimental .....	25
III.7    Desestabilización de uniones adherentes .....	25

III.8	Ensayos de migración .....	28
III.9	Ensayos de proliferación .....	28
III.10	Ensayos de inducción de 'sprouting' .....	29
III.11	Ensayo de angiogénesis en membrana corioalantoidea de embrión de pollo .....	29
III.12	Implantación de tumores .....	30
III.13	Estudio de la progresión tumoral y angiogénesis .....	30
III.14	Tratamiento estadístico de los resultados .....	32
<b>IV</b>	<b>Resultados</b>	<b>33</b>
IV.1	Efecto de las soluciones hiperpolarizantes de la membrana plasmática sobre la angiogénesis <i>in vitro</i> .....	33
IV.1.1	Introducción a las células de endotelio de aorta de bovino .....	33
IV.1.2	Efecto de las soluciones de valinomicina y cloruro de colina sobre el potencial de membrana plasmática en BAEC .....	36
IV.1.3	Efecto de las soluciones hiperpolarizantes del PMP sobre la organización del citoesqueleto de actina .....	39
IV.1.4	Efecto de las soluciones hiperpolarizantes del PMP sobre la migración celular en BAEC .....	44
IV.1.5	Efecto de las soluciones hiperpolarizantes del PMP sobre la proliferación celular en BAEC .....	46
IV.1.6	Efecto de las soluciones hiperpolarizantes del PMP sobre la inducción de 'sprouting' en BAEC .....	49
IV.2	Angiogénesis en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo .....	51
IV.3	Progresión tumoral <i>in vitro</i> .....	54
IV.3.1	Introducción a las células B16F1 .....	54
IV.3.2	Efecto de las soluciones de valinomicina y cloruro de colina sobre el PMP en B16F1 .....	56
IV.3.3	Efecto de las soluciones de valinomicina y cloruro de colina sobre la migración y proliferación celular en B16F1 .....	59
IV.4	Progresión tumoral en modelo de melanoma murino .....	62
<b>V</b>	<b>Discusión</b>	<b>68</b>



## Abreviaturas

Actina-F	-	Actina filamentosa
B16F1	-	Línea celular de melanoma murino
BAEC	-	Células de Endotelio de Aorta Bovino
BCE	-	Endotelio de Córnea de Bovino
BrdU	-	Bromodeoxiuridina
CAM	-	Membrana Corioalantoidea
ChoCl	-	Cloruro de colina
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DPBS	-	Buffer Salino Fosfato Dubelcco
EC	-	Extracto de Cerebro de rata
FDA	-	Diacetato de Fluoresceína
FGF-1	-	aFGF o FGF ácido
FGF-2	-	bFGF o FGF básico
HPMP	-	Hiperpolarización del Potencial de Membrana Plasmática
MDCK	-	Línea celular de células de epitelio de riñón de perro Madin Darby
MEM	-	Medio Esencial Mínimo
PAF	-	Paraformaldeído
PMP	-	Potencial de Membrana Plasmática
TX-100	-	Tritón X-100

## Resumen

Hallazgos previos de nuestro laboratorio indican que la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática (HPMP) provoca la compactación del citoesqueleto de actina hacia la periferia celular y determina un incremento en la estabilidad de las uniones celulares en diversas células de epiteliales en cultivo. En este tipo de tejidos el citoesqueleto de actina tiene un rol determinante en la estabilización de las uniones y la regulación dinámica de las mismas. Las uniones celulares en el tejido epitelial son esenciales para cumplir la función de barrera, mantener la integridad del tejido y la comunicación intercelular. En este sentido se ha encontrado que en diversos tipos de cáncer, la E-cadherina, fundamental en las uniones adherentes, se encuentra alterada y/o está menos expresada y que hay una relación inversa entre el nivel de cadherina funcional y la malignidad del tumor. A su vez, la proliferación, migración, diferenciación y apoptosis celular son todos eventos relevantes para el desarrollo del cáncer, y están en parte modulados por cambios en el potencial de membrana plasmática (PMP).

En esta tesis nos propusimos evaluar el efecto de la de la hiperpolarización del PMP sobre la angiogénesis y la progresión tumoral. Para cumplir con el objetivo se estudió, por un lado el efecto de la HPMP sobre la estabilidad de las uniones celulares y en algunos de los eventos claves de la angiogénesis como la migración, proliferación y la generación de 'sprouting', en células de endotelio de aorta en cultivo. Además se estudió el efecto de una solución hiperpolarizante sobre la angiogénesis en un modelo *in vivo*, la membrana corioalantoidea del embrión de pollo. Por otra parte se estudió el efecto de la HPMP sobre la progresión tumoral en células de melanoma murino en cultivo donde se evaluó la velocidad de migración y proliferación celular, y en melanomas implantados en ratones, midiéndose el tamaño tumoral, el grado de vascularización y el índice mitótico tumoral.

Los resultados mostraron que las soluciones de valinomicina y cloruro de colina hiperpolarizan el PMP en células de endotelio de aorta bovino en cultivo (BAEC), y que dicha hiperpolarización provoca una compactación del citoesqueleto de actina sobre la periferia celular y un aumento en la estabilidad de las uniones celulares. A su vez, se encontró que la HPMP inhibe la velocidad de migración, proliferación y generación de 'sprouts' celulares en células de endotelio de aorta en cultivo, sugiriendo una inhibición de la angiogénesis en un modelo *in vitro*. Si bien no se logró tener evidencia de que las soluciones de valinomicina y cloruro de colina hiperpolarizan el PMP en las células de melanoma murino, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en BAEC, ya que se encontró que dichas soluciones inhiben la velocidad de migración y proliferación celular. Finalmente, pudo demostrarse que la administración peritumoral *in vivo* de una solución de valinomicina, utilizada como agente hiperpolarizante, retrasa la progresión tumoral, induce una reducción en la vascularización del tumor y una disminución del índice mitótico tumoral.

Los resultados obtenidos en el marco de esta tesis podrían ser de utilidad en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en oncología.

# I. Introducción

Más del 90% de los cánceres humanos son de origen epitelial (Cooper, 1995). Las uniones celulares en el tejido epitelial son esenciales para cumplir la función de barrera, mantener la integridad del tejido y la comunicación intercelular. De esta manera se han estudiado las uniones ocluyentes y adherentes en células tumorales, y se ha encontrado que su disfunción juega un rol fundamental para que éstas adquieran un fenotipo invasivo y se desarrolle metástasis tumoral (Dusek and Attardi, 2011; Martin et al., 2013). A su vez, el citoesqueleto de actina tiene un rol determinante en la estabilización de las uniones y la regulación dinámica de las mismas (Dejana et al., 2009). Por otra parte, resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que el potencial de membrana plasmática (PMP) de diversas células epiteliales modula la organización del citoesqueleto y la estabilidad de las uniones celulares (Chifflet et al., 2004; Chifflet et al., 2003; Nin et al., 2009). También se ha estudiado el PMP en tejidos normales y cancerosos, encontrándose, en muchos tipos de cáncer, que los tejidos cancerosos tienden a estar más despolarizados que su contraparte normal (Yang and Brackenbury, 2013). En virtud de estos antecedentes, en esta tesis nos propusimos estudiar el efecto de la hiperpolarización del PMP sobre la angiogénesis y la progresión tumoral.

## *1.1 Epitelios*

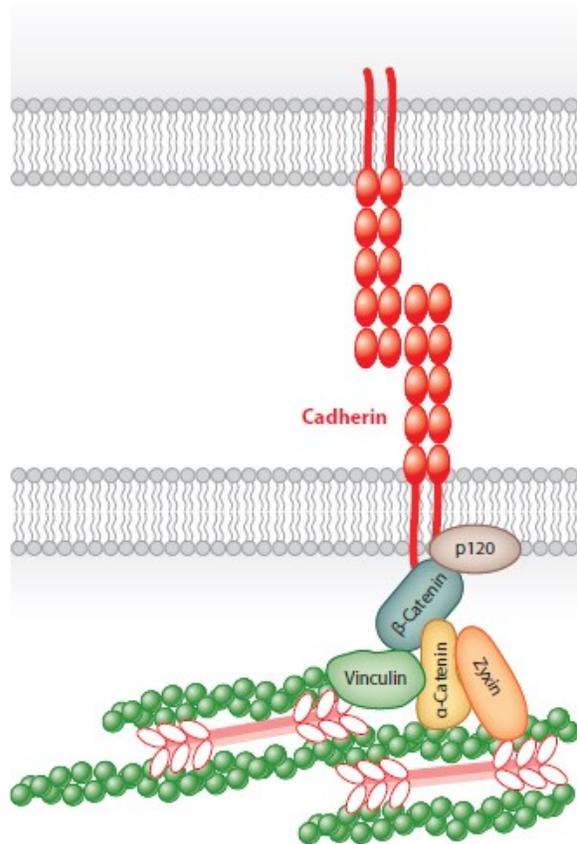
El epitelio es el tejido que recubre todas las superficies externas e internas del organismo. Las células en los epitelios están unidas por complejos de unión, formando así una barrera de permeabilidad selectiva. Cumplen variadas funciones en el organismo como protección, absorción, secreción y transporte. Aunque la morfología y características de cada epitelio es muy variada, todos comparten la característica de ser avascular y polarizado. Es decir, no tiene vasos sanguíneos, y la membrana plasmática está dividida en dos dominios, el dominio apical y el basolateral. El dominio apical que se encuentra en contacto con la luz de la cavidad o conducto, está separado a través de las

uniones estrechas con el dominio basolateral que está en contacto con la lámina basal o matriz extracelular (Simons and Fuller, 1985).

El endotelio vascular tapiza la superficie interna de todos los vasos sanguíneos y está constituido por una monocapa de células endoteliales. Las células endoteliales que revisten la pared vascular forman una barrera física y dinámica que regula el pasaje de células y moléculas entre el flujo sanguíneo y los tejidos circundantes (Schnittler et al., 2014). Están conectadas por uniones adherentes, ocluyentes y gap. Dichos complejos de unión tienen como rol principal, la integridad del tejido, la función de barrera y la comunicación intercelular, respectivamente (Wallez and Huber, 2008). Una elevada permeabilidad de los vasos sanguíneos es fundamental en la angiogénesis tumoral, como también lo es en otras patologías vasculares como la inflamación, edemas y sepsis (Aragon-Sanabria et al., 2017).

## *1.2 Uniones celulares en epitelios*

Las uniones adherentes son el tipo de unión célula-célula omnipresente en los endotelios. La organización general de estas uniones es muy similar estructural y funcionalmente en los distintos tipos celulares, pero sus componentes moleculares y su sentido biológico varían en los distintos tejidos. Las uniones adherentes están formadas por proteínas de adhesión transmembrana, pertenecientes a la familia de las cadherinas, organizadas en complejos proteicos y conectadas por su dominio citoplasmático al citoesqueleto (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema de la unión adherente clásica. La unión célula-célula tiene lugar cuando ocurre una interacción homofílica entre los dominios N-terminal de las regiones extracelulares de las cadherinas de tipo-1 de dos células vecinas. El extremo citoplasmático incluye principalmente las proteínas p120, β-catenina, y α-catenina que se unen directamente a la actina-F o indirectamente mediante otras proteínas de unión a la actina, como por ejemplo la vinculina. (Tomada de (Leckband and de Rooij, 2014)).

Las cadherinas son polipéptidos transmembrana de cadena simple con unión homofílica entre los dominios extracelulares de células vecinas. El dominio extracelular consiste en 5 repeticiones homólogas de 110 residuos que contienen sitios de unión calcio-dependientes. La región citoplasmática interactúa con proteínas pertenecientes a la familia “armadillo”, la β-catenina, plakoglobina, y p-120. La β-catenina y plakoglobina se unen a la α-catenina que media el enlace del complejo cadherina-catenina con el citoesqueleto de actina. La unión de dicho complejo con el citoesqueleto de actina es importante para estabilizar las uniones y además, contribuye al mantenimiento de la morfología de la célula y controla la migración celular (Cavallaro et al., 2006). La VE-cadherina es específica del endotelio y el mayor constituyente de la unión adherente de este tejido. Esta proteína es capaz de proteger a las células endoteliales de la apoptosis y

contribuye en la inhibición por contacto de la progresión celular (Cavallaro et al., 2006). El complejo cadherina-catenina es notablemente dinámico y su composición cambia rápidamente según el estado funcional de la célula (Dejana, 1996). Bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas, las proteínas del complejo cadherina/catenina son fosforiladas, lo que resulta en la disociación del complejo y la pérdida de estabilidad de la unión (Bertocchi et al., 2012; Komarova and Malik, 2010).

### *1.3 El citoesqueleto de actina en epitelios*

Para cumplir con la función de barrera el endotelio requiere de mecanismos rápidos y adaptativos para la regulación de las uniones. Esto se logra, en parte, gracias a la dinámica de los filamentos de actina, que interactúan con el complejo de unión VE-cadherina-catenina y el citoesqueleto de membrana (Schnittler et al., 2014). La interacción entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina es recíproca. Por un lado, la membrana actúa como regulador clave del citoesqueleto, ya que le provee de proteínas transmembrana o sitios de unión a lípidos, como sitios de anclaje, y como fuente de eventos y moléculas de señalización que controlan la organización del citoesqueleto. Por otro, el citoesqueleto es clave para determinar las propiedades biofísicas y bioquímicas de la membrana plasmática, como la forma, tensión, movimiento, composición, así como la movilidad, particionamiento y reciclado de sus componentes (Kapus and Janmey, 2013). La característica especial de los filamentos de actina es su capacidad de reorganizarse rápidamente en respuesta a diversos estímulos para cumplir distintas funciones celulares, por ejemplo en cicatrización de heridas o inflamación, o frente a cambios en la dinámica celular como cambios en la forma celular, migración o proliferación (Pollard et al., 2000).

Los filamentos de actina en las células endoteliales forman parte de complejos proteicos que incluyen las fibras de estrés, el anillo de actina cortical, y el citoesqueleto de membrana (Prasain and Stevens, 2009). Las fibras de estrés son haces de actomiosina

que se extienden a lo largo del citoplasma y son necesarias para la contracción celular y en la unión célula-matriz extracelular (Dudek and Garcia, 2001). El citoesqueleto de membrana se sitúa adyacente a la membrana plasmática y está compuesto principalmente por espectrina y actina. La actina contribuye en la organización de la membrana plasmática y provee una plataforma para interactuar con el anillo de actina cortical (Prasain and Stevens, 2009). El anillo de actina cortical, formado por haces largos de actina-F densamente empaquetados, está asociado directamente con el complejo de proteínas de las uniones adherentes, siendo esta asociación esencial para mantener la función de barrera endotelial y regular la permeabilidad celular (Prasain and Stevens, 2009; Schnittler et al., 2014).

#### *1.4 Uniones celulares y cáncer*

Las uniones celulares son de vital importancia para que las células tumorales desarrollen un fenotipo invasivo y para que se produzca metástasis tumoral. Tanto las uniones ocluyentes como las adherentes han sido estudiadas en este sentido en el cáncer. Por ejemplo, se ha encontrado que el factor de crecimiento de hepatocitos, que aumenta en algunos tipos de cáncer de mama y juega un rol clave en su desarrollo y progresión, modula la expresión y altera la función de las uniones ocluyentes, disminuyendo la resistencia transepitelial y aumentando la permeabilidad paracelular, lo cual estaría vinculado al aumento del potencial invasivo de las células cancerosas (Martin et al., 2004). A su vez, en la mayoría de los cánceres estudiados hay una menor expresión de E-cadherina, proteína fundamental en las uniones adherentes (Bruner and Derksen, 2018; Cavallaro and Christofori, 2004). Si bien se encuentra E-cadherina funcional en los tumores, hay una relación inversa entre el nivel de cadherina y la malignidad del tumor (Vleminckx et al., 1991). Se reportaron por ejemplo, estudios *in vivo* donde demuestran que la pérdida en la expresión de la E-cadherina coincide con la transición de adenomas a carcinomas en modelos de cáncer pancreático en ratón (Perl et al., 1998).

Colectivamente, los datos obtenidos de experimentos de células en cultivo, análisis de tumores humanos y estudios en modelos murinos, apoyan la función de las uniones adherentes como supresores de tumores (Dusek and Attardi, 2011). Sin embargo, no está claro si la inhibición en la migración provocada por la expresión de la E-cadherina, se debe directamente a la formación de las uniones adherentes o a su capacidad de alterar la organización del citoesqueleto de actina necesaria para la migración celular o a las vías de señalización que se activan por la formación de los complejos de las uniones adherentes (Defamie et al., 2014). Algunos investigadores (Herzig et al., 2007; Wong and Gumbiner, 2003), encontraron que la adhesión célula-célula no es necesaria ni suficiente para suprimir el fenotipo invasivo de las células tumorales. Si bien sugieren que el sitio de unión del dominio citoplasmático de la cadherina con la  $\beta$ -catenina sería el responsable de inhibir la invasión celular, descartan que sea la señalización de la  $\beta$ -catenina por sí misma y dejan abierta la interrogante sobre otros posibles mecanismos y moléculas señalizadoras para producir cambios en el potencial invasivo (Herzig et al., 2007; Wong and Gumbiner, 2003).

### *1.5 Potencial de membrana plasmática y citoesqueleto en epitelios*

El PMP cumple un rol fundamental en la fisiología celular de los distintos tipos celulares. Los cambios en el PMP son los responsables de la contracción muscular y el impulso nervioso, en las células excitables musculares y nerviosas. Las células no excitables también responden a cambios en el PMP, los que modulan actividades celulares importantes como la proliferación, diferenciación, migración, y apoptosis celular (Levin, 2007). El PMP participa en procesos celulares que incluyen el establecimiento y mantenimiento de la morfología, y características funcionales en células epiteliales. En particular, uno de los elementos celulares involucrado en muchas de dichas actividades y que es afectado por cambios en el PMP es el citoesqueleto (Chifflet and Hernandez, 2012). Tal como fue descrito por nuestro laboratorio, el PMP modula la organización del

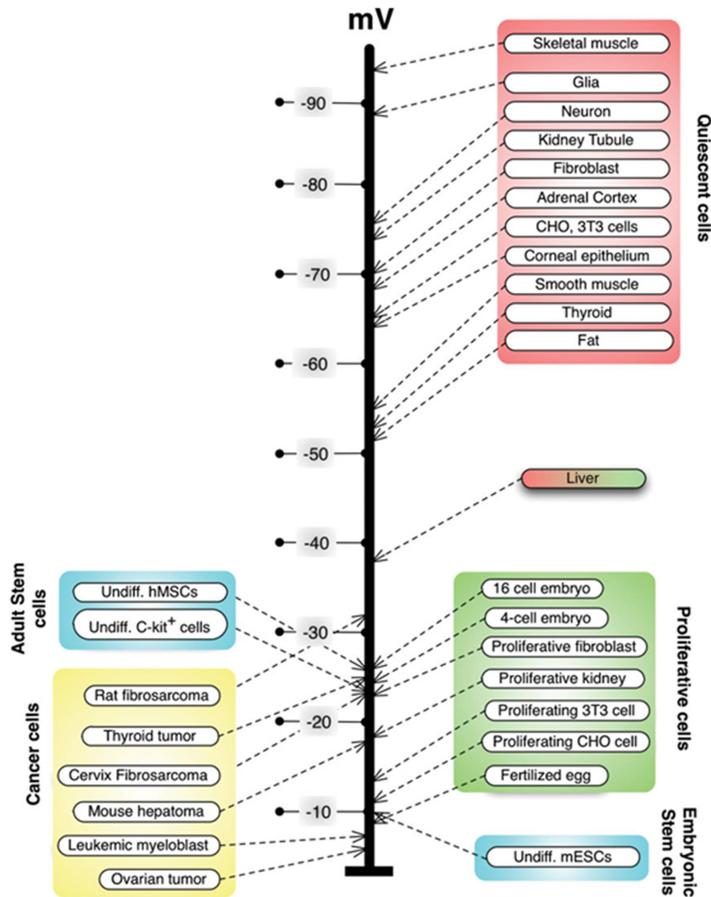
citoesqueleto y la estabilidad de las uniones celulares en células epiteliales (Chifflet et al., 2004; Chifflet et al., 2003; Nin et al., 2009). Se encontró que la despolarización inducida del PMP provoca la redistribución de la actina periférica hacia el citoplasma y eventualmente la apertura de las uniones celulares en células de endotelio de córnea de bovino (Chifflet et al., 2003), y en epitelios de cristalino de rata y endotelio de aorta de bovino (Chifflet et al., 2004). Este efecto ocurre en forma inespecífica, es independiente de la manera en que se provoque la despolarización. Asimismo, ocurre únicamente en monocapas confluentes y con las uniones intercelulares bien desarrolladas, por lo que la disposición periférica de la actina asociada a las uniones adherentes maduras es un requisito para observar tales modificaciones (Chifflet et al., 2004). Otros autores también han contribuido con esta idea, reportando luego que la despolarización del PMP afecta el estado de polimerización del citoesqueleto de actina cortical y provoca una disminución de la rigidez en células de endotelio vascular (Callies et al., 2011). El grupo de Szaszi y colaboradores encontró que la despolarización del PMP induce la fosforilación de la cadena liviana de la miosina mediante la vía de señalización Rho-Rho quinasa y este podría ser un mecanismo por el que se controla la permeabilidad intercelular en células tubulares renales (Szaszi et al., 2005). A su vez, también se encontró que la hiperpolarización del PMP provoca la compactación de los filamentos de actina hacia la periferia celular y determina un aumento en la estabilidad de las uniones adherentes en células de endotelio de córnea de bovino (BCE) (Nin et al., 2009).

### *1.6 Potencial de membrana plasmática y cáncer*

La proliferación, migración, diferenciación y apoptosis celular son todos eventos relevantes en el desarrollo del cáncer y que están en parte modulados por cambios en el PMP (Chernet and Levin, 2014). Se ha relacionado al PMP con el cáncer desde hace ya varios años, cuando se encontró que los valores del potencial de membrana son altos (más negativos) en quiescencia mitótica, y bajos (menos negativos) en la mitosis (Cone,

1971). En el mencionado trabajo los autores hiperpolarizan células de ovario de hámster (CHO) modificando la composición salina del medio y encuentran que con PMP de -45mV comienza a detenerse la mitosis, a -75mV la división es totalmente inhibida, y que cuando se despolariza a un PMP de -10mV el ciclo celular vuelve a reiniciarse. Dicha correlación entre el PMP y la mitosis se pone de manifiesto en el nivel de despolarización de las células en la transformación maligna. Las células despolarizadas tienden a ser plásticas, indiferenciadas y altamente proliferativas, mientras que las hiperpolarizadas tienden a ser maduras y diferenciadas (Cone, 1971; Pchelintseva and Djamgoz, 2017; Rao et al., 2015) (Figura 2). Nuevas evidencias mostraron que el potencial de membrana es menor en células cancerosas con respecto a las normales (Binggeli and Cameron, 1980; Marino et al., 1994; Sundelacruz et al., 2009), que los tumores *in vivo* solo presentan potencial de membrana despolarizado, e incluso que la hiperpolarización forzada es capaz de suprimir la formación de tumores (Chernet and Levin, 2013; Lobikin et al., 2012). Sin embargo, hay modelos que reportan una oscilación rítmica del potencial de membrana durante el ciclo celular, destacando la necesidad de la hiperpolarización para la síntesis del ADN en la proliferación celular (Blackiston et al., 2009), por ejemplo a través del aumento en la expresión de los canales de  $K^+$  Kv1.3 que provocan la hiperpolarización durante la proliferación celular (Perez Garcia et al., 2017). A su vez, en algunas células tumorales se encontraron comportamientos opuestos a los descritos arriba. Existen reportes en que la hiperpolarización provocada por la sobreexpresión del canal de  $K^+$  KCa2.3 incrementa la movilidad en células de melanoma (Chantome et al., 2009) y que la hiperpolarización estimula la proliferación en células de cáncer de mama (Wang et al., 1998; Wonderlin et al., 1995) y en melanoma (Lepple-Wienhues et al., 1996). Un aumento en los canales de potasio en pacientes de cáncer resulta en una hiperpolarización endotelial que provoca una mayor permeabilidad en las células endoteliales y por lo tanto colabora con la neovascularización (Prevarskaya et al., 2010).

El PMP ha sido propuesto como una señal bioeléctrica en células tumorales y se sugiere al PMP como un parámetro o marcador clínico para la detección de tumores, e incluso su modificación para el control o para inhibir la progresión tumoral y la metástasis (Chernet and Levin, 2014; Yang and Brackenbury, 2013).



**Figura 2.** Relación entre el PMP y el estado de la célula. Las células tienden a estar hiperpolarizadas en estado quiescente y terminalmente diferenciadas y despolarizadas en células altamente proliferativas, como las células madre y tumorales. Tomada de (Levin, 2012).

## *1.7 Angiogénesis*

Las células de mamífero requieren oxígeno y nutrientes para sobrevivir y por lo tanto se sitúan entre 100 y 200  $\mu\text{m}$  de distancia de los vasos sanguíneos, el límite de difusión de oxígeno. Para crecer más allá de este tamaño, los organismos multicelulares necesitan reclutar vasos sanguíneos por vasculogénesis y angiogénesis. La angiogénesis, formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos ya existentes, es un fenómeno esencial durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y la cicatrización de heridas. Este proceso es regulado por moléculas pro- y anti-angiogénicas, y se encuentra desregulado en varias enfermedades, especialmente el cáncer (Carmeliet, 2000). Diversos estudios experimentales enfatizaron la necesidad de angiogénesis asociada a tumores para que éstos crezcan más allá de los pocos milímetros de diámetro y para el desarrollo de metástasis (Mentzel et al., 2001). Las células endoteliales se encuentran dentro de las más quiescentes del organismo, pero su proliferación durante la angiogénesis llega a ser tan rápida como en células de médula ósea. Los eventos necesarios para el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos son, además de la proliferación endotelial, la degradación de la membrana basal de las células, la generación de brotes ('sprouts') a partir de vasos ya existentes, la invasión a la matriz extracelular y la maduración de las células endoteliales y organización de la luz endotelial (Folkman, 2006).

En las últimas décadas se han estado realizando grandes esfuerzos en el descubrimiento de moléculas pro- y anti-angiogénicas. Dichos conocimientos han liderado el desarrollo de tratamientos para el cáncer y otras enfermedades (Deryugina and Quigley, 2008). La vasculatura tumoral es un blanco atractivo para la terapia porque la provisión de oxígeno y nutrientes de un solo vaso sanguíneo influye en la supervivencia de una gran cantidad de células tumorales, así como también son una ruta principal de una posible metástasis (Tozer et al., 2005). La terapia vascular se ha concentrado en un enfoque antiangiogénico

con el fin de prevenir el proceso de neovascularización en tumores, mientras que enfoques anti-vasculares (vascular-disrupting) tienen el fin de romper rápida y selectivamente la vasculatura tumoral y por consiguiente propiciar la muerte de las células tumorales (Tozer et al., 2005).

### *1.8 Progresión tumoral*

La progresión tumoral es el término utilizado para referirse a la tendencia natural que tienen los tumores de transformarse en más agresivos o malignos con el paso del tiempo (Conti, 2010). Algunos de los cambios fenotípicos involucrados en la progresión tumoral son: la pérdida de la diferenciación celular y por lo tanto de la organización y polaridad del tejido (Vinay Kumar, 2003); la capacidad de crecer independientemente de estímulos externos; y el crecimiento descontrolado y capacidad de invadir la membrana basal, en el caso de los tumores de origen epitelial. La pérdida de expresión de E-cadherina y cambios en la expresión de las integrinas son eventos documentados en la progresión tumoral (Cairns et al., 2003), y de esta manera modificar las propiedades de adhesión celular (Conti, 2010).

## II. Hipótesis y Objetivos

### *Hipótesis*

La hipótesis principal de esta tesis es que la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática (HPMP) provoca la estabilización de las uniones celulares en BAEC y por lo tanto retarda la angiogénesis y la progresión tumoral.

### *Objetivo general*

El objetivo general de esta tesis es evaluar el efecto de la HPMP sobre la angiogénesis y la progresión tumoral en modelos *in vitro* e *in vivo*.

### *Objetivos específicos*

1. Estudiar el efecto de la HPMP sobre la estabilidad de las uniones celulares, proliferación, velocidad de cicatrización e inducción de “sprouting” en endotelio vascular de aorta de bovino en cultivo (BAEC), como modelo de angiogénesis *in vitro*.
2. Estudiar el efecto de la HPMP sobre la angiogénesis empleando como modelo la membrana corioalantoidea (CAM) del embrión de pollo.
3. Investigar el efecto de la HPMP sobre la diferenciación celular, proliferación y migración en células de melanoma murino en cultivo (células B16F1).
4. Evaluar el efecto de la HPMP sobre la angiogénesis y la progresión de melanomas implantados en ratones.

### III. Metodología

Todos los reactivos, anticuerpos y drogas se adquirieron en Sigma Chemical (St. Louis, MO), a menos que se especifique lo contrario.

#### *III.1 Soluciones y reactivos*

Solución control: NaCl 127 mM, KCl 5.4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.02 mM, CaCl<sub>2</sub> 3.6 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.8 mM y Hepes 10 mM, pH 7.4.

Soluciones hiperpolarizantes: Solución de cloruro de colina (ChoCl): igual que la solución control, sustituyendo al NaCl por ChoCl en cantidades equimolares, Solución de Valinomicina: solución control suplementada con valinomicina (1 µg/mL).

Soluciones despolarizantes: Solución de gluconato de potasio (KGl): igual que la solución control, sustituyendo al NaCl por KGl en cantidades equimolares, Solución de Gramicidina: solución control suplementada con gramicidina (1 µg/mL).

Buffer fosfato salino Dulbecco (DPBS): NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.9 mM pH 7.5.

#### *III.2 Cultivos de células, huevos embrionados y ratones*

Se utilizaron células de endotelio de aorta de bovino (BAEC) y células de melanoma de murino (B16F1).

Las BAEC, línea celular que se cultiva rutinariamente en el laboratorio, fueron obtenidas a partir de aortas frescas gentilmente brindadas por el Frigorífico Las Piedras. Para la obtención del cultivo primario de células endoteliales, las aortas se incubaron con colagenasa (65 U/mL) en PBS durante 20 min a 37 °C. A continuación, las células endoteliales se removieron raspando cuidadosamente con una espátula metálica roma y se colocaron en una placa de 35 mm con medio de cultivo suplementado con 10 % de

suero bovino fetal. Una vez alcanzada la confluencia, los sucesivos repiques se realizaron resuspendiendo con tripsina 0.05 %-EDTA 0.002 %. Los experimentos se realizaron con células entre el quinto y vigésimo pasaje con una relación de división (split ratio) 1/3. Los cultivos en los que aparecían células senescentes (células aplanadas y muy agrandadas) fueron descartados independientemente del pasaje (Augustin-Voss et al., 1993). Para los experimentos se utilizaron monocapas de células confluentes, de entre diez y quince días de cultivo, cultivadas sobre laminillas de vidrio en medio MEM (*Minimal Essential Medium*) suplementado con suero bovino fetal al 10 % y glutamina al 1 %.

Las células de melanoma murino B16F1, fueron amablemente cedidas por el Dr. Alejandro Chabalgoity (Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR) adquiridas en ATCC (American Type Culture Collection). En la mayoría de los experimentos se utilizaron monocapas de células confluentes cultivadas sobre laminillas de vidrio en medio MEM suplementado con suero bovino fetal al 10% y glutamina al 1 %.

Para el desarrollo de los estudios *in vivo* se utilizaron ratones C57BL/6 adquiridos en la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) y embriones de pollo gentilmente donados por las Avícolas ALA y PRODHIN.

Los ratones C57BL/6 machos de entre 6 y 8 semanas de edad se mantuvieron en la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) de Facultad de Medicina con temperatura y ciclos luz-oscuridad controlados, y comida y agua *ad libitum*. Los procedimientos fueron aprobados por la Comisión Ética en el Uso de Animales (CEUA; N° expediente: 071140-000128-10).

Los huevos embrionados fueron recogidos en la avícola y mantenidos en nuestro laboratorio en un baño húmedo a 37 °C bajo agitación constante para permitir su normal desarrollo.

Para cada experimento se utilizaron 10 ratones y 15 huevos embrionados en cada grupo (control y tratado).

### *III.3 Determinación de cambios en el potencial de membrana plasmática*

Los cambios relativos en el potencial de membrana plasmática se detectaron mediante microscopía de epifluorescencia con la sonda aniónica Oxonol V (Molecular Probes). El oxonol se almacenó a 4 °C en una solución 0.7 mM en etanol, y fue diluido en la solución correspondiente inmediatamente antes del experimento, en una concentración final de 0.3  $\mu$ M. Según resultados previos del laboratorio, el pico de intensidad tanto en la fluorescencia como en la remodelación de actina es a los 30 minutos (Chifflet et al., 2003). Por dicha razón, las monocapas confluentes de BAEC se trataron durante 30 minutos con soluciones control e hiperpolarizantes, ambas conteniendo oxonol y yoduro de propidio 1  $\mu$ g/mL como marcador de viabilidad. Luego de este lapso, las laminillas se ubicaron en un portaobjetos diseñado especialmente (ibid), en contacto con la solución correspondiente a temperatura ambiente. Se fotografiaron varios campos por laminilla, descartando aquellos campos en los que se observaban células positivas para el yoduro de propidio, utilizando el mismo tiempo de exposición para todas las fotos de un mismo experimento. Los cambios en las intensidades de fluorescencia se analizaron con la herramienta "Histograma" del programa Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.).

### *III.4 Microscopía de fluorescencia*

Para visualizar los distintos antígenos las laminillas con monocapas celulares se fijaron con paraformaldehído (PAF) 4 % en DPBS, suplementado con  $\text{CaCl}_2$ , 0.9 mM y  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM adicionados en el momento de su utilización, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se permeabilizaron con Tritón X-100 a concentraciones y tiempos variables para cada antígeno: 0.1 % durante 5 minutos para el "Von Willebrand Factor" y 0.5 % durante 30 minutos para la histona H3. A continuación se incubaron con el

anticuerpo primario correspondiente durante una hora en cámara húmeda a 37 °C en las siguientes diluciones realizadas con seroalbúmina bovina 1 % en DPBS: anti-HistonaH3 (phospho S10), 1/500 (Abcam); y anti-Von Willebrand Factor 1/400 (Sigma). Posteriormente se realizaron tres lavados con DPBS y se incubaron con el anticuerpo secundario durante una hora en cámara húmeda a 37 °C. Para revelar el anti-HistonaH3 (phospho S10) se utilizó el anticuerpo secundario anti-conejo AF 488 1/500 (Abcam), y el Von Willebrand Factor se reveló con el anticuerpo secundario anti-conejo Cy3 1/500 (Abcam). Para visualizar la actina, las laminillas se incubaron, junto con el anticuerpo secundario, con faloidina a FITC (Sigma) en una dilución 1/500. Finalmente, se realizaron nuevamente lavados con DPBS y uno final con agua destilada para luego montar en el portaobjetos sobre una gotita de Tris-glicerol 1:5.

Para la detección de BrdU (ver más abajo), las células se fijaron con etanol 70° a 4 °C durante 30 minutos. A continuación, se permeabilizaron con HCl 4 N durante 30 minutos y se incubaron con el anticuerpo anti-BrdU en una concentración final de 1/250 (Sigma). Posteriormente se reveló con el anticuerpo secundario anti-ratón-FITC (1/250) (Molecular Probes) conjuntamente con ioduro de propidio (1/1000).

Las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon eclipse i50, se fotografiaron y se analizaron las imágenes con los programas Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) y Fiji-ImageJ. La especificidad de la reacción fue verificada por controles negativos sin el anticuerpo primario.

### *III.5 Extendidos de endotelio de aorta*

Para la preparación de los extendidos de endotelio de aorta se fijaron las aortas frescas con PAF 4 % durante 20 minutos. Luego se raspó cuidadosamente con espátula metálica y se colocó el endotelio sobre una gotita de PBS en el portaobjetos. Posteriormente se permeabilizaron con Tritón X-100 0.5 % 15 minutos y se incubaron durante una hora en

cámara húmeda a 37 °C con el anticuerpo primario anti  $\beta$ -catenina en una dilución 1/4000 (Sigma) en seroalbúmina bovina 1 % en DPBS. Se reveló con el anticuerpo secundario Para visualizar la actina, los extendidos se incubaron, junto con el anticuerpo secundario anti-conejo Cy3 1/500 (Abcam), con faloidina a FITC (Sigma) en una dilución 1/500.

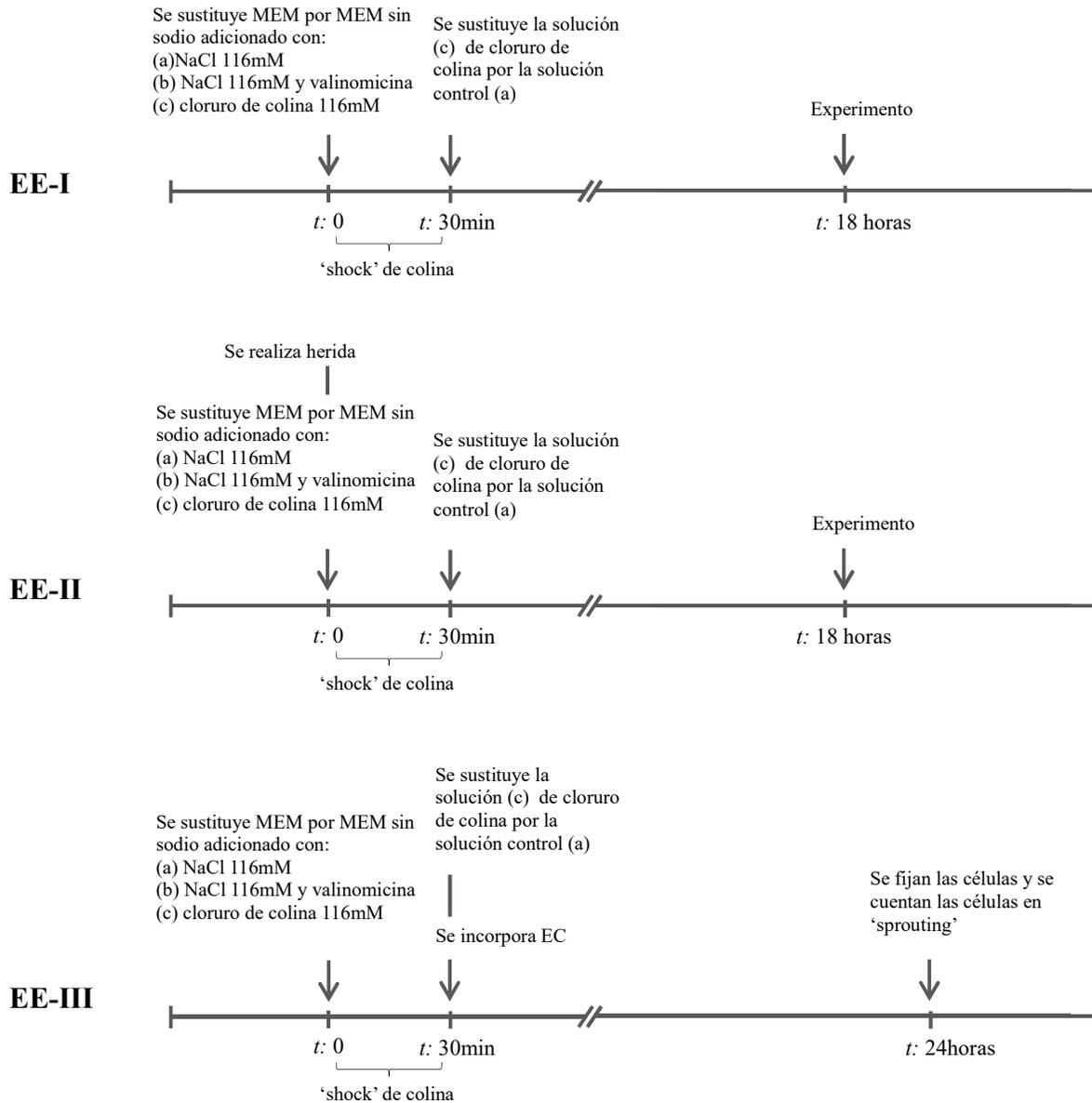
### *III.6 Estrategia experimental para el estudio de la estabilidad de las uniones celulares y de la migración, proliferación e inducción de 'sprouting'*

La hiperpolarización a largo plazo del PMP se realizó incubando las células con las soluciones hiperpolarizantes en medio, entre 18 y 24 horas antes de realizar el experimento. Para ello se utilizó medio sin sodio, adicionado con NaCl 116 mM, NaCl 116 mM y valinomicina (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y cloruro de colina 116 mM, para las soluciones (a) control, e hiperpolarizantes de (b) valinomicina y (c) cloruro de colina, respectivamente. En el caso de la solución de cloruro de colina, se realizó un procedimiento al que denominamos 'shock' de colina en el que se incubaron las células por 30 minutos con cloruro de colina y luego se sustituyó nuevamente por medio de cultivo. Se muestran en la Figura 3 representaciones de las estrategias experimentales para los distintos experimentos.

### *III.7 Desestabilización de uniones adherentes*

La desestabilización de las uniones adherentes se realizó incubándolas durante 10 a 20 minutos en solución sin  $\text{Ca}^{2+}$ . Las monocapas de BAEC se trataron con las soluciones control e hiperpolarizantes a largo plazo como describe la EE-I (Figura 3) para evaluar su resistencia a la desestabilización de las uniones célula-célula. El efecto de la solución sin calcio se evaluó observando en el microscopio de contraste de fase hasta que se detectaran separaciones intercelulares en alguna de las monocapas. En ese momento se

detuvo el experimento fijando las laminillas con PAF y se procesaron para visualizar la actina como se explica en *Microscopía de fluorescencia*.



**Figura 3. Estrategias experimentales.** Representaciones de las distintas estrategias utilizadas en los experimentos. La EE-I fue utilizada para los experimentos de desestabilización de uniones y ensayos de migración en BAEC, y para el estudio de la proliferación celular en B16F1. La EE-II en el estudio de proliferación en BAEC y migración en B16F1. La EE-III se utilizó para explorar la inducción de sprouting en BAEC.

### *III.8 Ensayos de migración*

Se estudió el efecto de los tratamientos hiperpolarizantes sobre la velocidad de migración de las monocapas celulares de BAEC y B16F1. Para ello se realizaron heridas con el extremo de una aguja y se fotografiaron las heridas inmediatamente después de realizadas y al final del experimento, aproximadamente 6 y 24 horas después en BAEC (EE-1) y B16F1 (EE-II), respectivamente. El porcentaje de migración con respecto al control se estimó, mediante análisis de imagen, determinando la diferencia entre el área de la herida inicial y el área de la herida final.

### *III.9 Ensayos de proliferación*

El índice de proliferación se determinó mediante la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina que se integra al ADN en la fase S del ciclo celular, en BAEC, e inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-histona H3 marcador de mitosis en B16F1.

En BAEC se realizaron heridas en monocapas confluentes como se describe en la EE-II (Figura 3). Se realiza una herida para que las células endoteliales cambien de su estado casi quiescente a un fenotipo proliferativo, como ocurre en el proceso de cicatrización de heridas. A las 18 horas se incorporó el BrdU (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubó por 6 horas. Se calculó el índice de proliferación celular mediante análisis de imagen dividiendo el número de células que incorporaron BrdU por el total de células en las primeras cinco filas del borde de la herida.

En B16F1 se procedió según la EE-I (Figura 3) y se determinó el índice de proliferación celular mediante el conteo de núcleos positivos para el marcador de mitosis sobre el total de núcleos en al menos cinco campos por laminilla tomados al azar. No es necesario realizar una herida como en BAEC porque es una línea celular altamente proliferativa y que no presenta inhibición por contacto de la proliferación.

### *III.10 Ensayos de inducción de sprouting*

Se utilizó extracto de cerebro de rata obtenido de acuerdo a lo descrito por Barritault et al., omitiendo el último paso de precipitación con sulfato de amonio (Barritault et al., 1982). El extracto fue esterilizado por filtración y utilizado en los cultivos a una concentración final de 60 µg/mL. El cerebro de rata es rico en FGF-1 (inicialmente llamado aFGF o FGF ácido) (Esch et al., 1985a; Esch et al., 1985b) y FGF-2 (inicialmente llamado bFGF o FGF básico) (Gonzalez et al., 1995). El FGF-1 induce a las células endoteliales a desarrollar una morfología tubular *in vitro* (Mori et al., 2013) y el FGF-2 induce 'sprouting' *in vitro* (Gajdusek et al., 1993; Montesano et al., 1986; Mori et al., 2013). Para evaluar el efecto de las soluciones de valinomicina y cloruro de colina sobre la generación de 'sprouting', se adicionó el extracto de cerebro a monocapas confluentes de BAEC del grupo control y tratadas (EE-III, Figura 3). Luego, a las 24 horas se cuantificó el número de células en 'sprouting' mediante fotografía de contraste de fase. Se tomaron 5 fotografías por laminilla de zonas tomadas al azar.

### *III.11 Ensayo de angiogénesis en membrana corioalantoidea de embrión de pollo*

Los ensayos angiogénesis *in vivo* se realizaron siguiendo el protocolo descrito por (West et al., 2001), con algunas modificaciones. Brevemente, se incubaron los huevos embrionados en una cámara húmeda a 37 °C con agitación. El día 3 se les realizó un agujero en el extremo puntiagudo para extraerle 2 mL de albúmina y luego el día siguiente se realizó un cuadrado de 1 cm<sup>2</sup> en el extremo no puntiagudo por donde se inoculó desde el día 7, durante tres días consecutivos, las soluciones control y tratada (0.3 mL). Al finalizar el experimento en el día 10 de desarrollo del embrión, se retiró la cáscara que rodea la cámara de aire para exponer la membrana corioalantoidea (CAM), con el fin de fotografiar las membranas para su posterior análisis de imagen. Se evaluó el

grado de angiogénesis en los grupos tratado (valinomicina en PBS, 2.5 µg/mL) y control (PBS y DMSO, la cantidad de DMSO correspondiente a la cantidad de DMSO en que está disuelta la valinomicina) mediante análisis de imagen, contando el número de ramificaciones de los vasos sanguíneos. Se descartaron los huevos contaminados o con embriones muertos (caracterizados por una CAM opaca, rota o sin embrión viable).

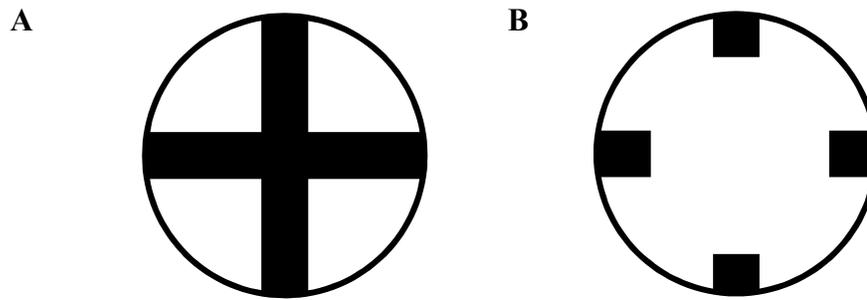
### *III.12 Implantación de tumores*

Para su implantación en tumores, las células B16F1 se levantaron de la caja de Petri con tripsina, se lavaron y resuspendieron en PBS. Se determinó el número de células mediante microscopía óptica utilizando una cámara de Neubauer. Se comprobó la viabilidad de las células de la suspensión con una solución de diacetato de fluoresceína (FDA) 0.1 µg/mL según describe el protocolo de Ormerod (Ormerod, 2000). En el bioterio, los ratones afeitados dos días antes con crema depilatoria, se inyectaron con 200 µL de la suspensión celular utilizando jeringas independientes. Los tumores se implantaron realizando inyecciones subcutáneas en el flanco derecho de cada ratón de una suspensión de  $1.5 \times 10^6$  células viables.

### *III.13 Estudio de la progresión tumoral y angiogénesis*

A los cinco días de la inyección de las células tumorales en los ratones éstos se inocularon en la zona peritumoral en dos grupos: el grupo tratado (valinomicina en PBS, 2.5 µg/mL); y el grupo control (PBS y DMSO, la cantidad de DMSO correspondiente a la cantidad de DMSO en que está disuelta la valinomicina). Se realizaron inoculaciones diarias hasta el décimo día. La evaluación de la progresión tumoral se realizó midiendo el tamaño de los tumores, luego de sacrificar los animales el día doce mediante dislocación cervical, de acuerdo a la siguiente fórmula:  $\text{largo} \times \text{ancho}^2 \times \pi/6$  (Egami et al., 2003; Langenkamp et al., 2011; Prewett et al., 1999). Posteriormente, se fijaron los tumores extraídos durante 1 hora con PAF 4 %, se incubaron en soluciones de sacarosa 10, 20 y

30 % para criopresevar el tejido, y por último se congelaron en OCT (Sakura, Torrance,CA) a -20 °C. El estudio de la angiogénesis se realizó mediante cortes histológicos y tinción con factor de Von Willebrand para identificar los vasos sanguíneos. Se evaluó la densidad vascular, expresada como la superficie positiva para el factor de Von Willebrand (en píxeles), normalizado por la superficie de la sección central del tumor (Egami et al., 2003; Prewett et al., 1999; Rose et al., 1999; Stockmann et al., 2008). Para medir la superficie vascular se utilizó la herramienta 'thresholder' del programa Fiji-ImageJ, en fotografías tomadas cubriendo en forma de cruz una sección del centro de los tumores, como se muestra en la Figura 4A. Se estudió el índice de mitosis en los tumores mediante tinción con el anticuerpo marcador de mitosis anti-HistonaH3 (phospho S10). Se contaron las células proliferativas en los bordes de la sección central del tumor (Figura 4B), ya que es únicamente en el borde del tumor donde se puede observar proliferación celular.



**Figura 4. Esquema de las regiones cuantificadas en los tumores.** Representación del área a evaluar en las secciones centrales de los tumores. El círculo representa la sección de la región central del tumor estudiada y en negro el área evaluada. **A.** Se estudió la vascularización tomando fotografías en los ejes centrales del tumor en forma de cruz. **B.** Se estudió el índice de proliferación contando las células en mitosis en los bordes del tumor en las posiciones centrales de arriba, abajo, derecha e izquierda.

### *III.14 Tratamiento estadístico de los resultados*

Todos los experimentos *in vitro* se realizaron al menos tres veces de forma independiente y cada uno por duplicado. Además, en cada uno de los experimentos se analizaron al menos cinco campos de la laminilla tomados aleatoriamente, excepto en los ensayos de migración y proliferación donde se analizó todo el largo de la herida.

La significación estadística entre el grupo control y los grupos tratados se analizó mediante el test t de Student. Las diferencias entre los grupos experimentales fueron consideradas significativas cuando  $p < 0.05$ .

## IV. Resultados

### *IV.1 Efecto de las soluciones hiperpolarizantes de la membrana plasmática sobre la angiogénesis in vitro*

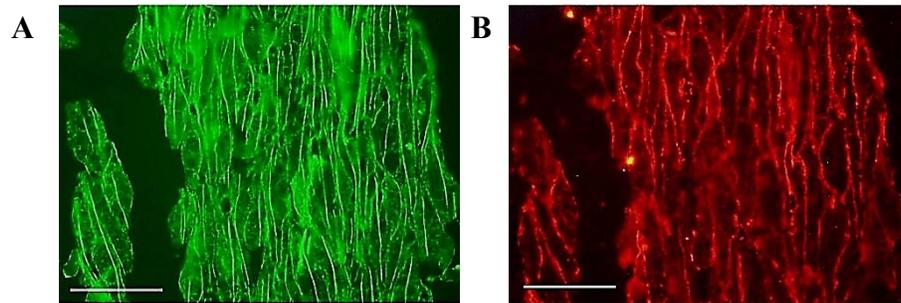
Tal como ocurre en la angiogénesis, en el proceso de cicatrización de heridas, las células endoteliales también cambian de un estado casi quiescente a un fenotipo migratorio y proliferativo para cubrir el área vacía y restablecer la continuidad del tejido. Por este motivo se incluyen frecuentemente experimentos de cicatrización de células endoteliales *in vitro* en los estudios destinados a evaluar la angiogénesis (Goodwin, 2007; Ngo et al., 2014; Staton et al., 2004). En la angiogénesis, además de los mencionados procesos de migración y proliferación celular, también ocurre la invasión de las células a la matriz extracelular denominado 'sprouting'. *In vitro*, la pérdida de la morfología pavimentosa y la elongación y migración hacia la membrana basal del cultivo es también denominada 'sprouting' y en base estas características y a la aparición de marcadores bioquímicos específicos se la considera el equivalente *in vitro* de la angiogénesis *in vivo* (Canfield and Schor, 1995). De acuerdo a lo anterior, para evaluar la 'angiogénesis' *in vitro*, en esta tesis estudiamos el efecto de la HPMP sobre la estabilidad de las uniones celulares, proliferación, velocidad de migración y generación de 'sprouting'.

#### *IV.1.1 Introducción a las células de endotelio de aorta de bovino*

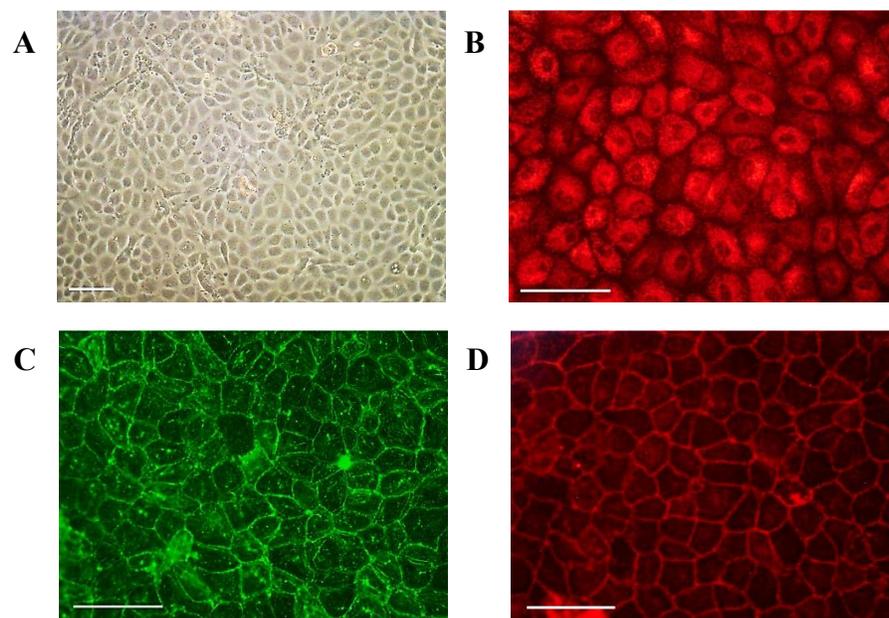
Si bien las células de endotelio de aorta *in situ* presentan una forma poligonal alargada como consecuencia del estrés provocado por el flujo de sangre (Figura 5), en condiciones de cultivo estacionario, su morfología se modifica adoptando un fenotipo pavimentoso característico. En la Figura 5 se muestra una doble tinción fluorescente de un extendido de endotelio de aorta *in situ*. Este preparado fue procesado para poner en evidencia actina-F y  $\beta$ -catenina, dos proteínas que, en los epitelios bien diferenciados,

por formar parte de las uniones intercelulares, se concentran en la región juxtamembrana y permiten apreciar la forma celular.

La Figura 6 corresponde a imágenes de endotelio de aorta en cultivo en confluencia. En microscopía de contraste de fase se observa la morfología típica de fenotipo endotelial con crecimiento en monocapa y apariencia pavimentosa (Figura 6A). En la Figura 6B se observa que todas las células son positivas para el factor de Von Willebrand, específico de células endoteliales vasculares, comprobando de este modo su identidad e indicando que los cultivos no están contaminados con otros tipos celulares. También se aprecia en las monocapas confluentes de BAEC que las células logran desarrollar uniones adherentes características de una línea celular endotelial bien diferenciada, evidenciado principalmente por la presencia de la actina y beta-catenina sobre la periferia celular (Figura 6C, D).



**Figura 5. Extendido de endotelio de aorta de bovino. A.** Tinción con faloidina-FITC para revelar actina-F. **B.** Inmunofluorescencia de  $\beta$ -catenina. Barra: 100  $\mu$ m.



**Figura 6. Endotelio de aorta de bovino en cultivo en confluencia. A.** Microscopía de fase. **B.** Inmunofluorescencia de Factor de Von-Willebrand. **C.** Tinción con faloidina-FITC para revelar actina-F. **D.** Inmunofluorescencia de beta-catenina. Barra: 100  $\mu$ m.

### *IV.1.2 Efecto de las soluciones de valinomicina y cloruro de colina sobre el potencial de membrana plasmática en BAEC*

El potencial de membrana plasmática (PMP) es la diferencia de potencial eléctrico entre el citoplasma y el exterior celular, generada por la distribución desigual de iones a ambos lados de la membrana determinada por mecanismos de transporte activo y por las distintas permeabilidades de los diferentes iones. Dicha diferencia está aproximadamente expresada por la ecuación de Goldman-Hodgkin-Kats (Ecuación 1), según la cual el potencial de membrana plasmática ( $V_m$ ) está dado por:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na} [Na]_e + P_K [K]_e + P_{Cl} [Cl]_i}{P_{Na} [Na]_i + P_K [K]_i + P_{Cl} [Cl]_e} \quad (\text{Ecuación 1})$$

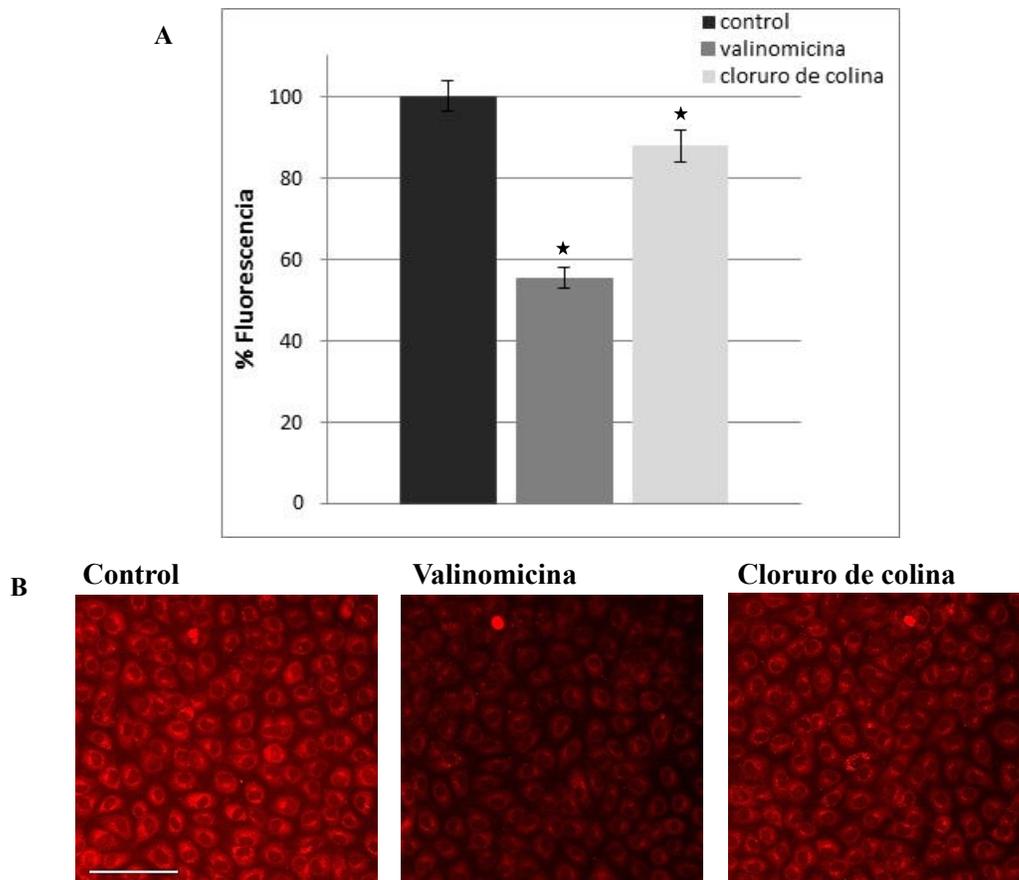
$R$  – Constante universal de los gases ideales,  $T$  – Temperatura en Kelvin,  $F$  – Constante de Faraday,  $P$  – Permeabilidad de la membrana al ion,  $[ ]$  – Concentración del ion

Los cambios en el potencial de membrana plasmática se monitorizaron utilizando la sonda potenciométrica oxonol V. Dicha sonda es un anión hidrofóbico que entra en las células y se distribuye en las membranas intracelulares de acuerdo al equilibrio de Nernst, emitiendo fluorescencia en una relación lineal al potencial de membrana plasmática (Epps et al., 1994). Un aumento en la intensidad de fluorescencia corresponde a la despolarización del potencial de membrana plasmática, y a la inversa, la hiperpolarización del potencial de membrana provoca una disminución en la fluorescencia. Las sondas potenciométricas tienen la ventaja de que pueden ser aplicadas en la gran mayoría de las preparaciones, no son invasivas y permiten el análisis de un gran número de células simultáneamente (Bashford and Smith, 1979; Dall'Asta et al., 1997; Kukkonen et al., 1996). Es por esto que son particularmente apropiadas para medir cambios relativos en el potencial de membrana, aunque con la desventaja de que se necesita una curva de calibración para poder tener una medida absoluta

(Klapperstuck et al., 2009). Por otra parte, dentro de los métodos electrofisiológicos, la técnica de patch-clamp es considerada el método de referencia para medir cuantitativamente el potencial de membrana plasmática, siendo uno de los métodos más sensibles y confiables (Akaike and Harata, 1994; Klapperstuck et al., 2009). Sin embargo, al igual que sucede con el uso de microelectrodos para determinar el potencial de membrana, son técnicas muy laboriosas, con las desventajas de poder medir únicamente unas pocas células, no poder ser aplicadas en todos los tipos celulares (por el tamaño o resistencia de la membrana), ser invasivas en algunos casos, entre otras (Ehrenberg et al., 1988).

Se utilizaron dos estrategias para lograr la hiperpolarización del potencial de membrana. Una de ellas consistió en añadir valinomicina a la solución control. La valinomicina actúa como ionóforo específico del ion  $K^+$ , por lo que provoca una hiperpolarización del potencial de membrana plasmática debido a su efecto final de aumentar la corriente saliente de  $K^+$  intracelular. La otra estrategia es sustituir el  $Na^+$  extracelular por un catión no permeable a la membrana plasmática, como la colina. Esta maniobra permite eliminar la entrada de  $Na^+$  extracelular, lo que provoca la hiperpolarización del potencial de membrana.

Los resultados presentados en la Figura 7, muestran diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia de oxonol V de monocapas confluentes de BAEC para las soluciones de valinomicina y cloruro de colina con respecto a la solución control. La disminución de la intensidad de fluorescencia en las soluciones de valinomicina y cloruro de colina, luego de 30 minutos de incubación, revela la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática.



**Figura 7. Efecto de las soluciones hiperpolarizantes del potencial de membrana plasmática sobre la fluorescencia de oxonol V en BAEC. A.** Intensidad de fluorescencia de oxonol (Unidades Arbitrarias, UA) en BAEC provocadas por las soluciones de valinomicina y cloruro de colina (\* indica diferencia significativa,  $p < 0.05$ ) **B.** Imágenes de fluorescencia de oxonol V de las células incubadas en las distintas soluciones. Barra: 100  $\mu$ m.

### *IV.1.3 Efecto de las soluciones hiperpolarizantes del potencial de membrana plasmática sobre la organización del citoesqueleto de actina*

Los tratamientos de las monocapas confluentes de BAEC con soluciones hiperpolarizantes mostraron un reordenamiento en el citoesqueleto de actina, como se muestra en la Figura 8. En dicha figura se puede observar una redistribución de los filamentos de actina hacia la periferia celular, marcando un anillo de actina periférica mejor delimitado y más intenso en las condiciones hiperpolarizantes. Estos resultados son similares a los encontrados en nuestro laboratorio en células de endotelio de córnea en cultivo (Nin et al., 2009). En el mencionado artículo se reporta que la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática, producida con las mismas soluciones que en este trabajo, provoca una compactación de la actina-F sobre la membrana plasmática a nivel de las uniones adherentes así como un aumento en la estabilidad de dichas uniones.

Con el fin de evaluar la posible utilidad de los tratamientos hiperpolarizantes en modelos animales *in situ*, se realizó otra serie de experimentos destinados a determinar la duración de los efectos de dichos tratamientos. En ellos, las monocapas celulares fueron expuestas a las soluciones de valinomicina y cloruro de colina 24 horas antes de su análisis.

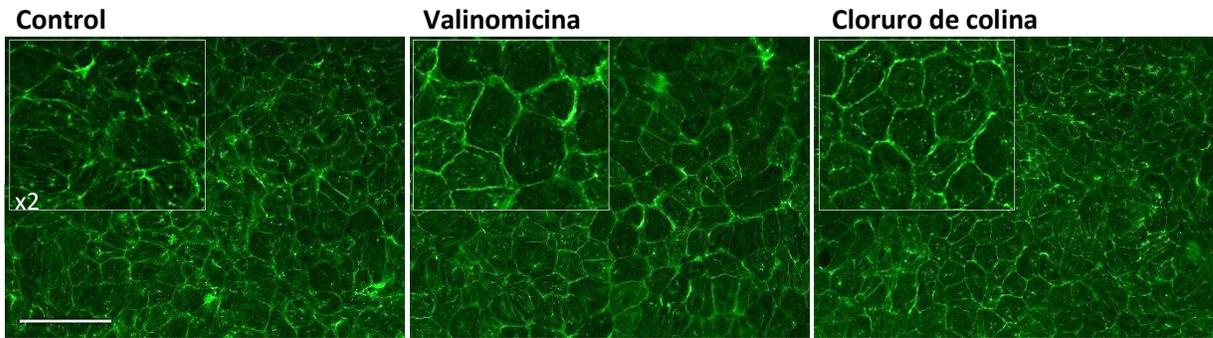
En virtud de que no es posible mantener a las células en una solución salina por tiempos prolongados, el diseño de los experimentos con las soluciones de cloruro de colina fue diferente al de los experimentos con soluciones de valinomicina. Para los tratamientos con soluciones de cloruro de colina se realizó un procedimiento que llamamos 'shock' de colina, en el que las células se exponen a la solución de cloruro de colina durante 30 minutos en medio sin sodio y luego se vuelven a incubar en medio sin suero en la estufa hasta el día siguiente en el momento del experimento, como se explica en las estrategias experimentales de Metodología (EE-I). Para los tratamientos con valinomicina

simplemente se adiciona el ionóforo en medio sin suero 24 horas antes de realizar los experimentos. La Figura 9 muestra un experimento en el que las monocapas fueron tratadas con las soluciones control, valinomicina y 'shock' de colina, 24 horas previas a la incorporación de oxonol V para observar los posibles cambios en el potencial de membrana para estas soluciones. Como se observa en dicha figura, a las 24 horas todos los tratamientos presentaron un mismo nivel de fluorescencia. El hecho de no encontrar diferencias en la fluorescencia de oxonol V a las 24 horas, revela que, los efectos provocados por dichos tratamientos (ver más adelante) se generaron al principio de los mismos cuando sí provocaron modificaciones en el PMP como se mostró en la Figura 7.

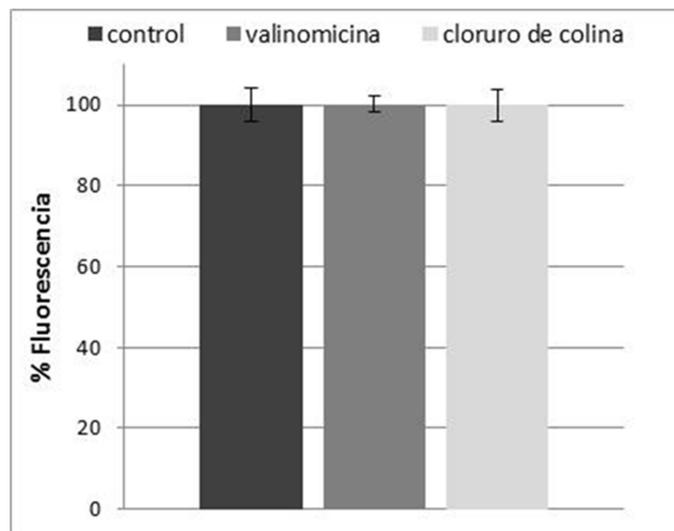
El efecto de las soluciones hiperpolarizantes sobre la distribución de la actina es sutil en estas condiciones. Como se observa en la Figura 10 (A, C, E), la redistribución de la actina hacia la periferia celular en las monocapas incubadas con valinomicina o con el 'shock' de cloruro de colina luego de 24 horas es menos evidente que en los tratamientos de hiperpolarización cortos. Asimismo, se estudió si como consecuencia del reordenamiento y compactación del citoesqueleto de actina sobre la membrana las uniones celulares tenían mayor estabilidad, como se encontró para los tratamientos cortos en células de endotelio de córnea de bovino en cultivo (Nin et al., 2009). Para ello se evaluó la resistencia de las mismas a la falta de calcio. Como se observa en la Figura 10 (B), en la monocapa control la ausencia de  $Ca^{2+}$  provoca la desestabilización de las uniones celulares, evidenciada por la aparición de grandes espacios intercelulares, que se muestran mediante flechas en la figura. Por el contrario, en las células tratadas con las soluciones hiperpolarizantes, luego del tratamiento sin  $Ca^{2+}$  (Figura 10 D, F), se observa que las células mantienen la adhesión celular prácticamente en la totalidad de la monocapa.

El citoesqueleto de actina es fundamental en la regulación de las uniones adherentes. Actúa directamente vía componentes de unión a la actina en las uniones o indirectamente organizando el tráfico intracelular y otras estructuras del citoesqueleto

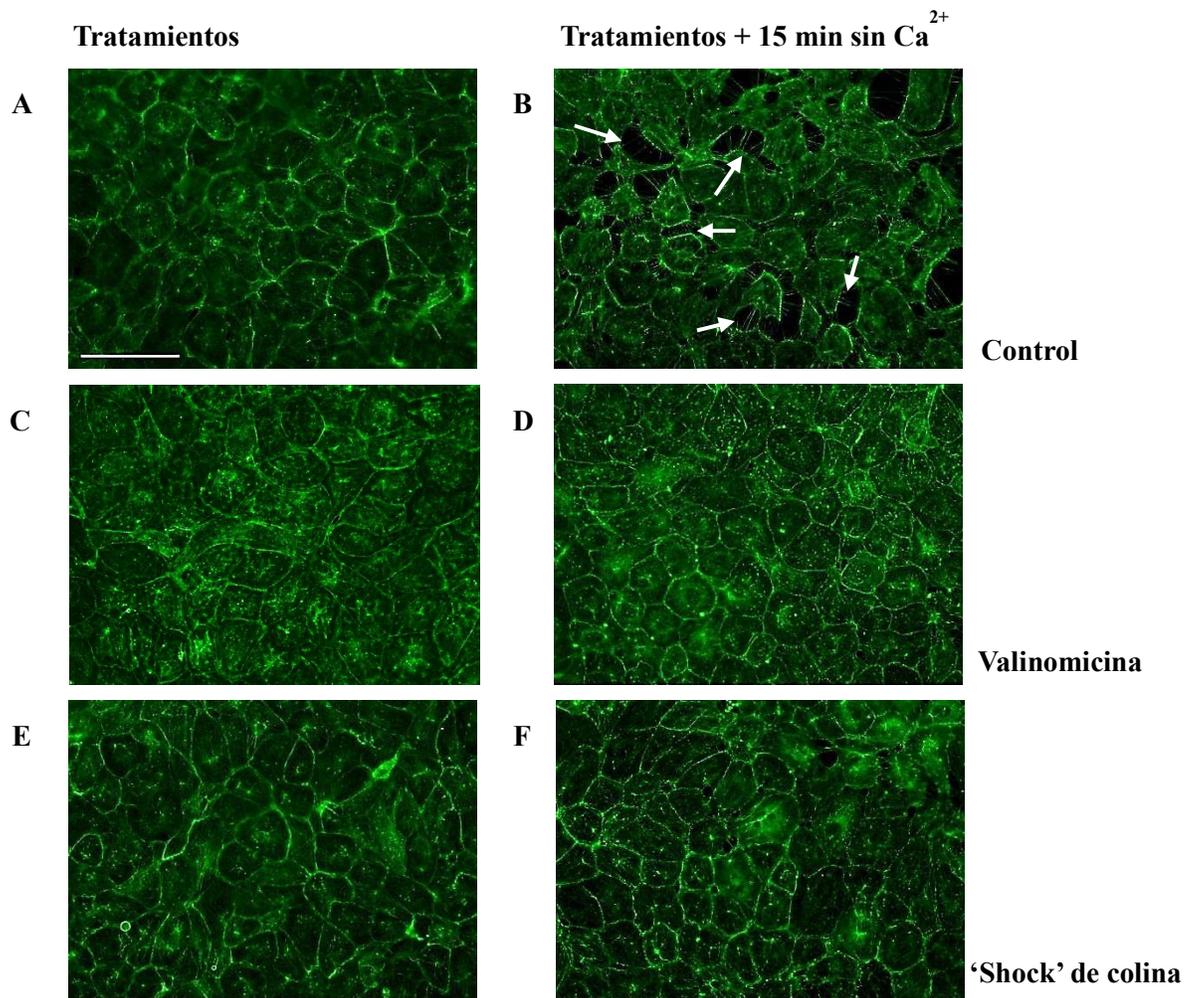
(Ivanov, 2008). Por lo tanto, estos resultados sugieren que los cambios en el potencial de membrana plasmática provocan una reorganización del citoesqueleto de actina a nivel de la membrana plasmática, o de otros componentes de las uniones célula-célula, que no son tan evidentes a largo plazo como lo son en los tratamientos de corta duración. A pesar de ello, dicha reorganización ayuda en mantener la estabilidad de las uniones adherentes durante un tiempo prolongado.



**Figura 8. Efecto de las soluciones hiperpolarizantes sobre la distribución de la actina.** Monocapas de BAEC incubadas durante 30 minutos en solución control, con valinomicina y con cloruro de colina. Tinción con faloidina FITC para revelar la actina-F. Se muestran recuadros con la imagen ampliada para apreciar mejor el efecto producido en la organización del citoesqueleto de actina. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .



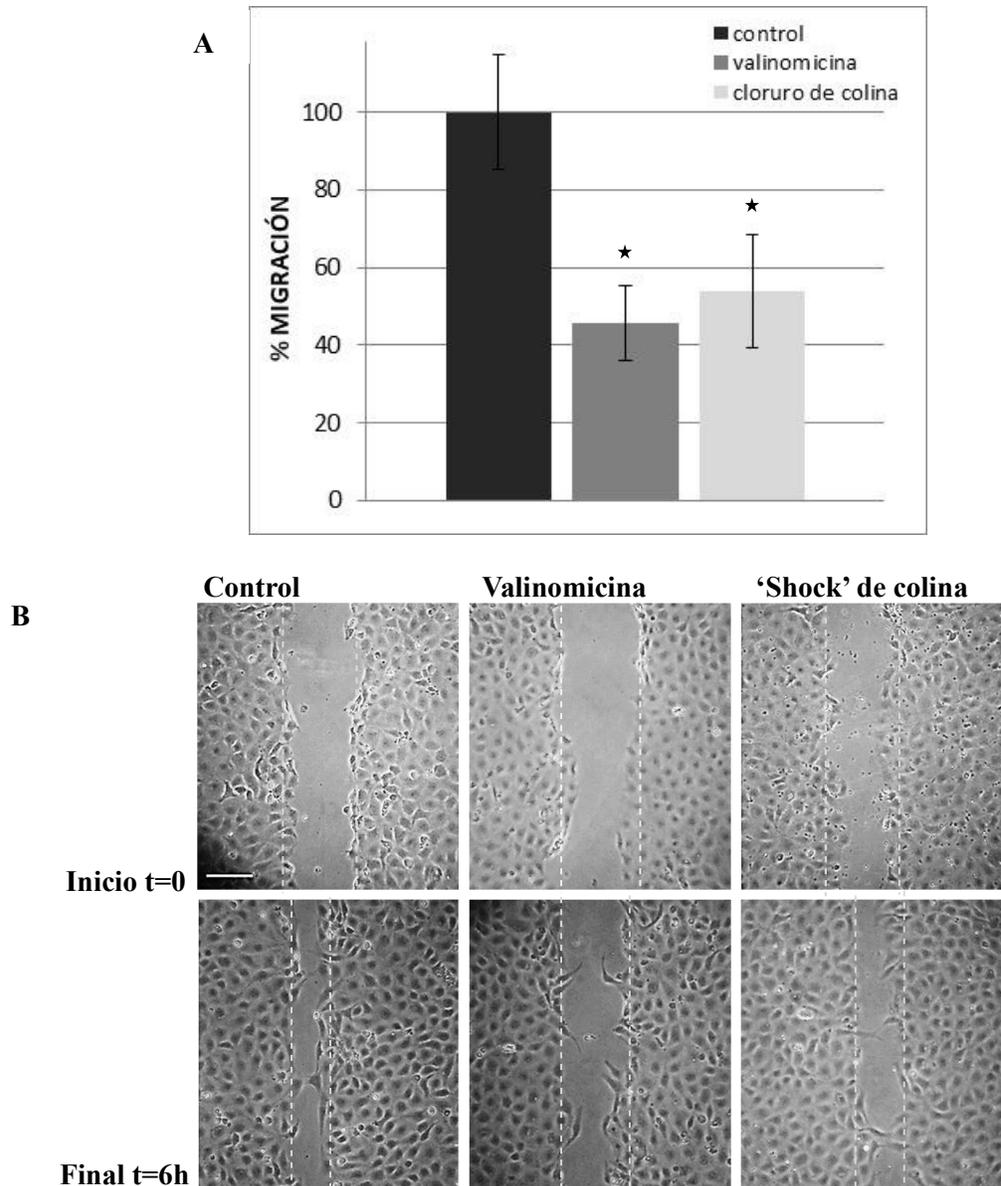
**Figura 9. Intensidad de fluorescencia de oxonol V para las soluciones control, de valinomicina y cloruro de colina medida a las 24 horas.** Las medidas de fluorescencia se realizaron luego de suplementar con bis-oxonol, durante 30 minutos, las soluciones control de valinomicina y cloruro de colina, incubadas en el correspondiente medio el día anterior. La gráfica muestra que no hay diferencia en la intensidad de fluorescencia.



**Figura 10. Efecto a largo plazo de las soluciones hiperpolarizantes sobre la distribución de la actina y estabilidad de las uniones.** Las células se incubaron en las soluciones de valinomicina 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y de cloruro de colina durante 30 min ('shock' de colina), 24 horas antes de realizar los experimentos. Se determinó la estabilidad de las uniones celulares evaluando su resistencia a la falta de calcio extracelular. Tinción con faloidina FITC para revelar actina-F, en los tratamientos (A) control, (C) valinomicina y (E) 'shock' de colina, y en los tratamientos con remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  (B) control, (D) valinomicina y (F) 'shock' de colina. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

#### *IV.1.4 Efecto de las soluciones hiperpolarizantes del potencial de membrana plasmática sobre la migración celular en BAEC*

Los microfilamentos de actina cumplen el rol de generar la fuerza necesaria para la migración y son esenciales para mantener la integridad del endotelio por su asociación con el sustrato y por formar parte de los complejos de unión intercelulares (Lee and Gotlieb, 2003). Asimismo, Peglion y colaboradores, encontraron que las uniones adherentes experimentan un proceso dinámico de ‘treadmilling’ a lo largo de su cara lateral durante la migración colectiva. Este proceso permite que se produzcan cambios rápidos en las interacciones intracelulares necesarios para dirigir la migración celular, y que se mantenga la integridad de la monocapa (Peglion et al., 2014). Teniendo en cuenta estos antecedentes y una vez hallado el efecto de los cambios del potencial de membrana sobre el citoesqueleto y las uniones celulares, se investigó si la hiperpolarización del PMP provoca cambios en la velocidad de migración en BAEC. Para ello, se preincubaron monocapas de BAEC con soluciones hiperpolarizantes y al día siguiente se realizaron heridas mecánicas y se dejaron migrar en estufa de cultivo durante 6 horas. Se tomaron fotografías en contraste de fase inmediatamente luego de realizada la herida y al concluir el experimento. Los resultados se presentan en la Figura 11. En el gráfico (Figura 11A) se muestra que el tratamiento de 24 horas con valinomicina 0.5 µg/mL inhibe aproximadamente 54% la velocidad de migración y que el ‘shock’ de colina determina una inhibición de la velocidad de migración de aproximadamente 46% a las 24 horas de realizado el tratamiento. Este resultado, en conjunto con antecedentes que explican el rol del citoesqueleto y las uniones adherentes en la migración celular colectiva y la importancia del potencial de membrana plasmática en la cicatrización celular (Chifflet et al., 2005; Lee and Gotlieb, 2003; Peglion et al., 2014), sugieren que la hiperpolarización del potencial de membrana en BAEC provoca una reorganización del citoesqueleto de actina que a su vez provocan mayor



**Figura 11. Efectos a largo plazo de la hiperpolarización sobre la velocidad de migración celular.** Se determinó la velocidad de migración midiendo la superficie de la herida inmediatamente luego de realizar el tajo y al final del experimento. **A.** Gráfica de velocidad de migración de monocapas tratadas con solución control y las soluciones hiperpolarizantes. Se grafican los promedios  $\pm$  desvío estándar. El \* indica diferencia significativa respecto al control ( $p < 0.05$ ). **B.** Fotografías en microscopio de contraste de fase que muestran la herida al inicio y luego de migrar durante 6 horas, para los distintos tratamientos. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

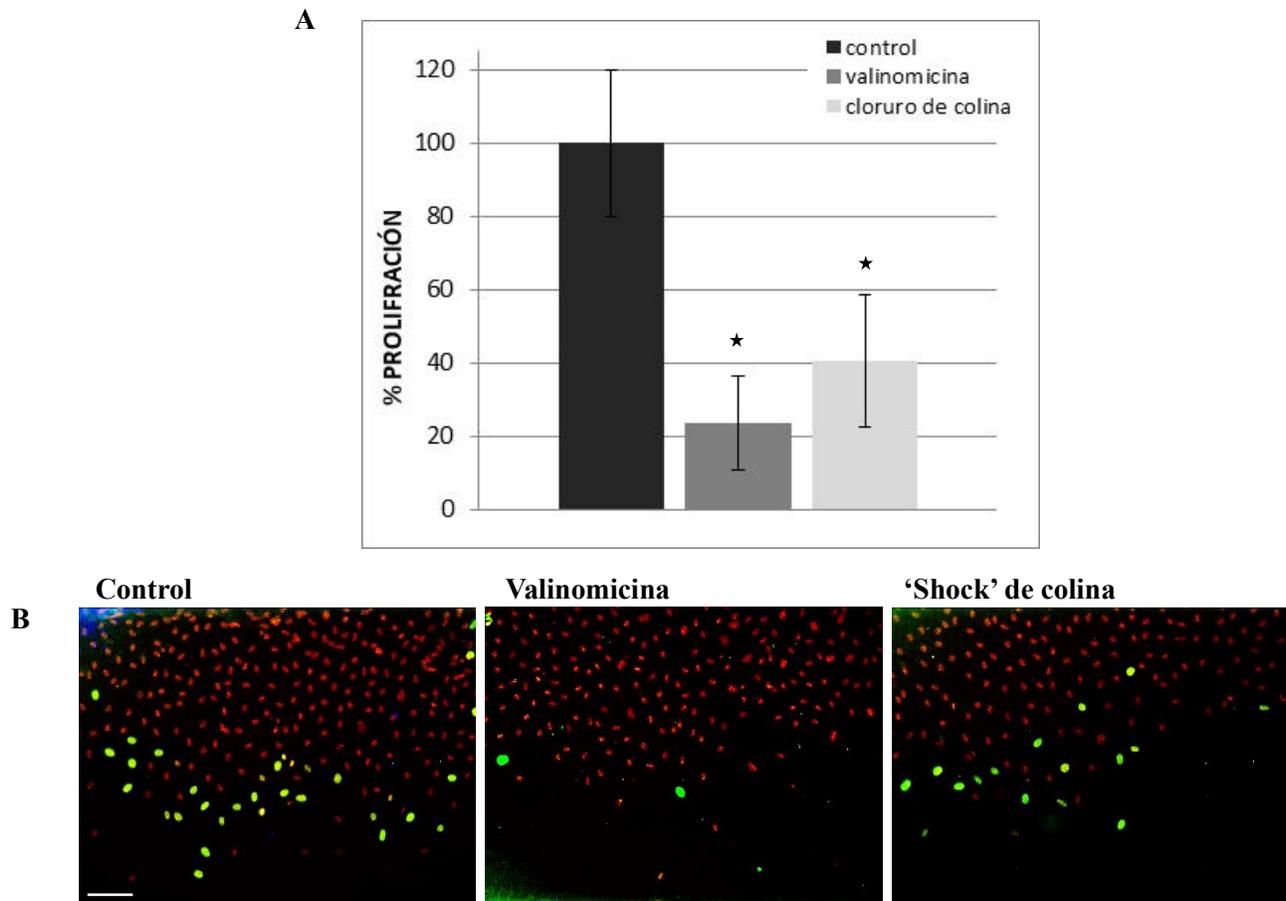
estabilidad en las uniones adherentes y que en conjunto provocan una disminución en la velocidad de migración.

#### *IV.1.5 Efecto de las soluciones hiperpolarizantes del potencial de membrana plasmática sobre la proliferación en BAEC*

Como se mencionara en la Introducción, la  $\beta$ -catenina participa en la formación de las uniones adherentes en el endotelio, mediando el enlace entre las cadherinas y el citoesqueleto de actina (Dejana, 1996). Su localización depende del estado funcional de la célula, acumulada en la periferia celular en células quiescentes, o distribuida en el citoplasma y núcleo en células proliferativas. En el núcleo activa diversos genes, tales como la ciclina D o myc involucrados en el inicio del ciclo celular (Wallez and Huber, 2008). En base a estos antecedentes, junto con la necesidad de las células de romper las uniones para dividirse, y tomando en consideración el efecto de la hiperpolarización sobre las uniones celulares descrito anteriormente, se investigó si la hiperpolarización del PMP provoca cambios en la de proliferación celular.

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que en el endotelio de aorta en cultivo la proliferación celular es máxima entre las 18 y 24 horas luego de realizar una herida (Tesis de Maestría (Evans, 2011)). Asimismo, en este trabajo se verificó que la gran mayoría de las células que se duplican, son las células líder que se separan de la monocapa y las de las primeras cinco filas del borde de la herida. Tomando estos datos como referencia, se estudió la proliferación en BAEC mediante la incorporación de BrdU en dicho período de tiempo en monocapas control e hiperpolarizadas. Se midió el índice de proliferación dividiendo el número de células en fase S por el total de células de las primeras cinco filas.

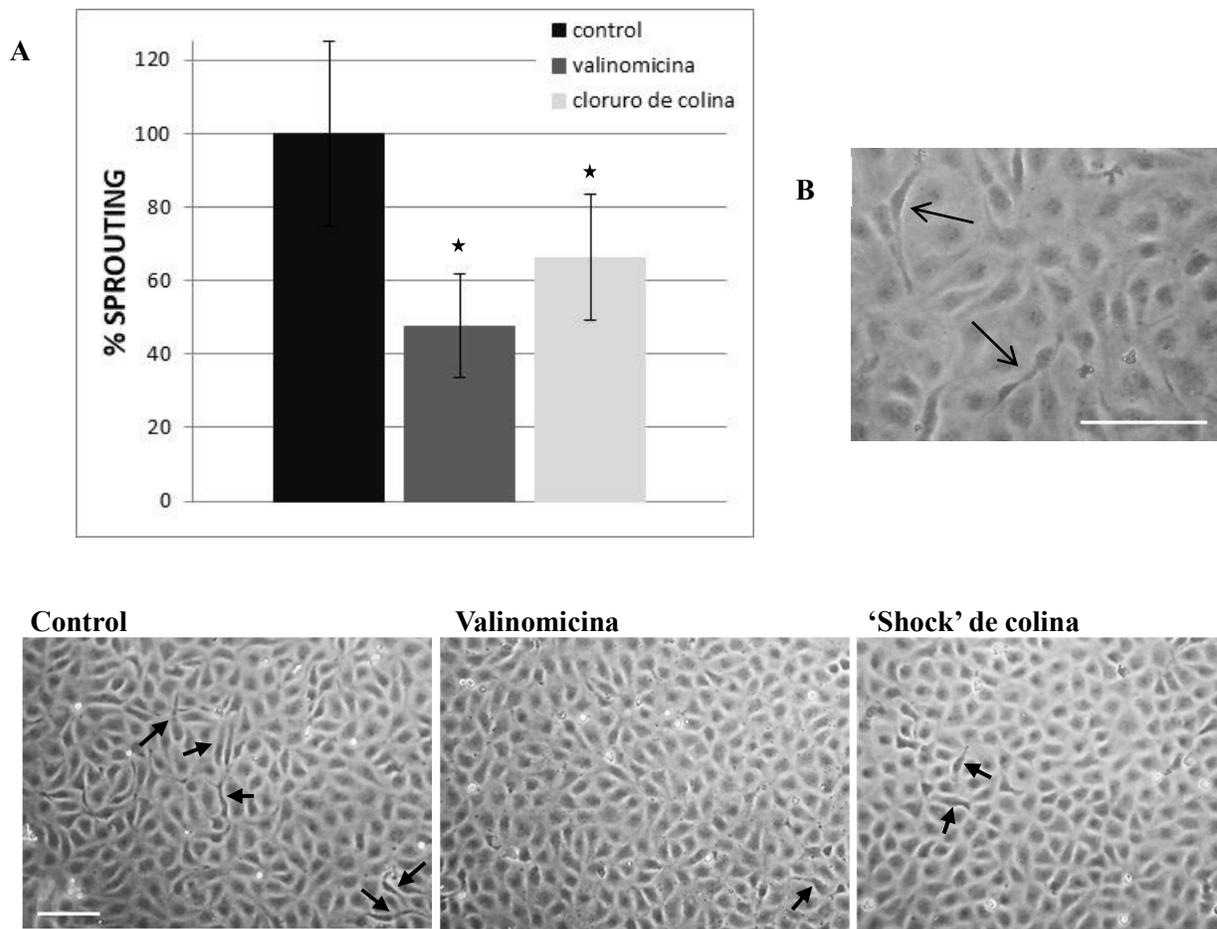
En la gráfica de la Figura 12 se muestra que el tratamiento de 24 horas con valinomicina y el 'shock' de colina determinan una inhibición de la proliferación de aproximadamente 79 y 63%, respectivamente.



**Figura 12. Efecto de la hiperpolarización a largo plazo sobre la proliferación celular.** Se determinó el índice de proliferación contando la cantidad de células que se encuentran en fase de duplicación mediante la incorporación de BrdU a las 24 horas de realizada la herida. **A.** Gráfica de índice de proliferación de monocapas tratadas con solución control y las soluciones hiperpolarizantes. Se grafican los promedios  $\pm$  desvío estándar. El \* indica diferencia significativa respecto al control ( $p < 0.05$ ). **B.** Imágenes representativas para los distintos tratamientos de monocapas de BAEC 24 horas luego de una herida mecánica donde se observan las células que incorporaron BrdU en verde y los núcleos marcados con yoduro de propidio en rojo. Barra: 100  $\mu$ m.

#### *IV.1.6 Efecto de las soluciones hiperpolarizantes del potencial de membrana plasmática sobre la inducción de 'sprouting' en BAEC*

Otro evento importante en la angiogénesis es la invasión hacia la matriz extracelular, donde las células adoptan una morfología alargada y tubular, o como se denomina generalmente, 'sprouting'. Se han desarrollado distintos modelos *in vitro* donde las células en cultivo son inducidas para cambiar su fenotipo en reposo, de apariencia pavimentosa, a uno angiogénico en 'sprouting' (Canfield and Schor, 1995; Gajdusek et al., 1993; Montesano et al., 1986). Tomando como referencia el trabajo de Gajdusek et al. en el que inducen el 'sprouting' utilizando FGF-2 y TGF- $\beta$ , se realizaron los tratamientos control, con valinomicina y 'shock' de colina e inmediatamente después se incubaron con medio de cultivo suplementado con extracto de cerebro (EC) (EE-III). El extracto de cerebro es rico en FGF-2 (Gonzalez et al., 1995) y en FGF-1 (Esch et al., 1985a; Esch et al., 1985b; Thomas and Gimenez-Gallego, 1986). Al día siguiente se pudo observar la presencia de sprouting en las distintas monocapas en microscopio de fase (Figura 13B, flechas). Los resultados muestran un menor porcentaje de 'sprouting' en las células tratadas con las soluciones de valinomicina y cloruro de colina con respecto al control. El porcentaje de 'sprouting' es de 48 y 66% para el tratamiento a largo plazo con valinomicina y el 'shock' de colina respectivamente (Figura 13A).



**Figura 13. Efecto de la hiperpolarización a largo plazo sobre la inducción de ‘sprouting’.** **A.** La gráfica muestra los porcentajes de ‘sprouting’ de los tratamientos control, valinomicina y ‘shock’ de colina. Se grafican los promedios  $\pm$  desvío estándar, en unidades arbitrarias. El \* indica diferencia significativa respecto al control ( $p < 0.05$ ). **B.** Imágenes de microscopía de fase. Las flechas señalan células con morfología alargada y tubular, característico de células en ‘sprouting’. Barra: 100  $\mu\text{m}$ . **C.** Imágenes representativas de monocapas tratadas con EC luego de los distintos tratamientos. Las flechas señalan las células en ‘sprouting’. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

## *IV.2 Angiogénesis en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo*

Los resultados obtenidos en el modelo *in vitro*, mostraron que el tratamiento con valinomicina provoca la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática y como consecuencia una reorganización del citoesqueleto y estabilización de las uniones celulares. Asimismo, provoca una inhibición en la velocidad de migración, en la proliferación y en la cantidad de sprouting en BAEC. Estos resultados son la base del estudio del efecto de dicha solución sobre la angiogénesis en modelos *in vivo*.

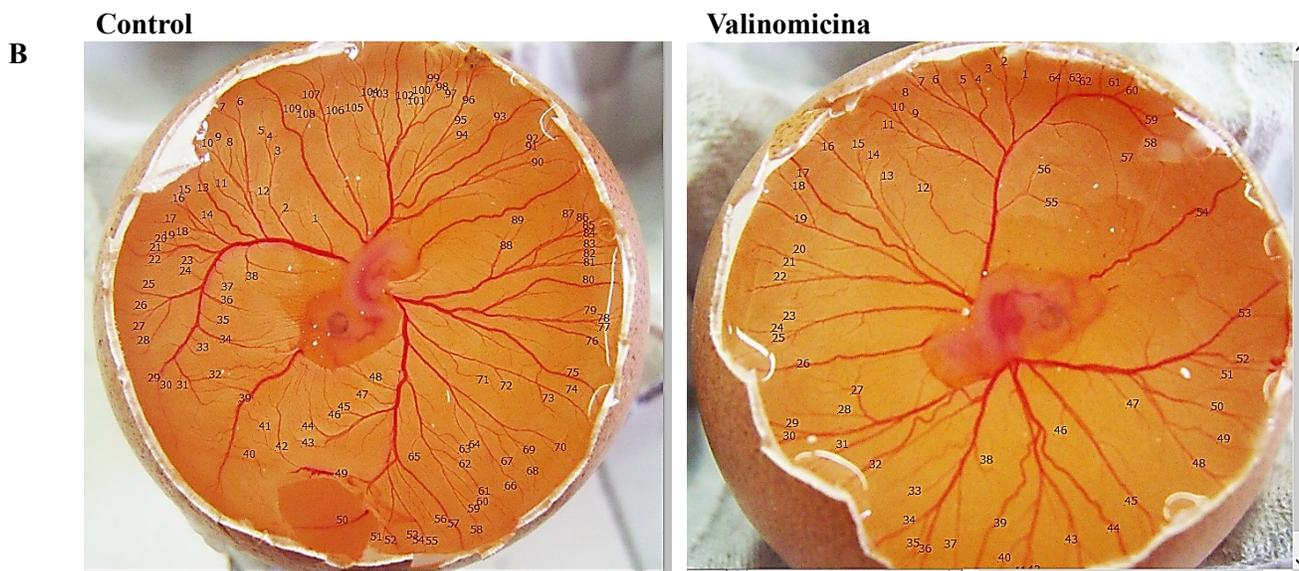
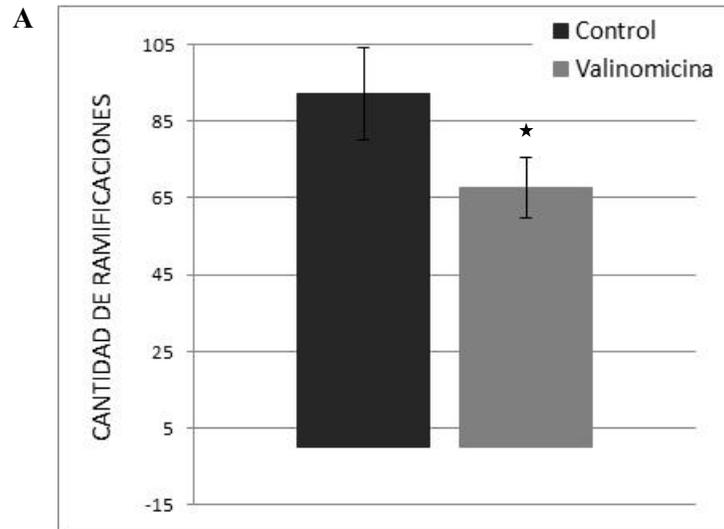
Entre los modelos animales utilizados como herramientas para analizar los mecanismos subyacentes a la angiogénesis, los modelos de embrión de pollo han sido de gran utilidad para estudiar el potencial angiogénico de diferentes compuestos (Deryugina and Quigley, 2008; West et al., 2001).

La membrana corioalantoidea es un tejido respiratorio especializado y muy vascularizado que permite el intercambio gaseoso entre el embrión y la atmósfera circundante. Es altamente angiogénica hasta los días 11 o 12 del desarrollo del embrión, y por lo tanto entre los días 8 y 10 de desarrollo es cuando es principalmente receptiva para estímulos pro-angiogénicos adicionales o para factores anti-angiogénicos (Deryugina and Quigley, 2008).

Se evaluó aquí, el efecto de la solución de valinomicina sobre la vascularización de la membrana corioalantoidea en embrión de pollo. Con este propósito, se inocularon los huevos embrionados con las soluciones control y tratada, como se indica en Metodología. Se analizó el número de ramificaciones de los vasos sanguíneos, como indicador del nivel de angiogénesis.

En la Figura 14 se puede observar imágenes demostrativas del grupo control y tratado que muestran el conteo de las ramificaciones vasculares. Los resultados indicaron que, durante el desarrollo del embrión de pollo, la incubación con la solución de valinomicina

provoca una disminución en el grado de angiogénesis en la membrana corioalantoidea de 26%.



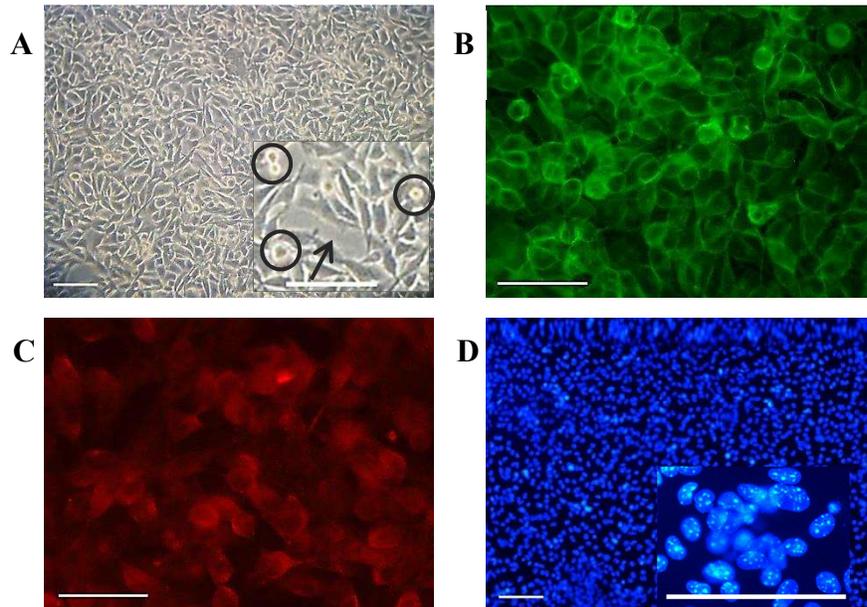
**Figura 14. Angiogénesis en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo.** Se contó el número de ramificaciones vasculares de la membrana corioalantoidea en huevos incubados con soluciones control y de valinomicina como indicador del grado de angiogénesis. **A.** Gráfica que muestra la cantidad de ramificaciones en los distintos tratamientos. Se grafican los promedios  $\pm$  desvío estándar. El \* indica diferencia significativa respecto al control ( $p < 0.05$ ). **B.** Fotografías representativas de la membrana corioalantoidea el día 12 de desarrollo del embrión cuando se realizó el análisis. Se muestra el conteo para el grupo control y tratado.

### *IV.3 Progresión tumoral in vitro*

Los resultados mostrados en las secciones anteriores mostraron que las soluciones de cloruro de colina y valinomicina inhiben la angiogénesis en modelos *in vitro* e *in vivo*. El siguiente objetivo fue el estudio del efecto que podría tener la solución de valinomicina en la progresión tumoral. Para ello se realizaron estudios en células de melanoma de murino en cultivo (B16F1) y en tumores implantados en ratones, como se mostrará en la siguiente sección. Aquí presentamos los resultados obtenidos en la migración y proliferación celular para los tratamientos con cloruro de colina y valinomicina en las B16F1 en cultivo.

#### *IV.3.1 Introducción a las células B16F1*

Las células de melanoma de murino (B16F1) presentan las características fenotípicas de las células tumorales en cultivo: poca adhesividad entre las células y entre las células y la matriz, y ausencia de inhibición por contacto. Aunque el cultivo se deje evolucionar, no llega en ningún momento a alcanzar la confluencia debido a que las células se desprenden y quedan espacios entre ellas. Este efecto se describe en la Figura 15A donde se puede observar células que se desprenden del cultivo, caracterizadas por adquirir forma redondeada, y espacios intercelulares (se marcan en el inserto a mayor aumento con círculos y flechas, respectivamente). También se aprecia la forma redondeada de las células visible principalmente en la tinción de actina y una distribución de la  $\beta$ -catenina en el citoplasma, que sugiere uniones intercelulares débiles, ya que en uniones celulares fuertes dicha proteína se distribuye principalmente sobre la membrana (Figuras 15B,C). A su vez, se puede observar con la tinción con Hoechst 33258 en la Figura 15D, un acúmulo de núcleos superpuestos, indicativo de la superposición de células.



**Figura 15. Células de melanoma de murino en cultivo. A.** Microscopía de contraste de fase. En el inserto a mayor aumento se indica con una flecha los espacios libres de la monocapa y con círculos las células que se están desprendiendo del cultivo. **B.** Tinción con faloidina FITC para revelar la actina-F. **C.** Inmunofluorescencia de  $\beta$ -catenina. **D.** Tinción nuclear con Hoechst 33258. En el inserto a mayor aumento se muestra un acumulo de núcleos marcados donde pueden observarse núcleos superpuestos, indicativos de superposición de células. Barra: 100  $\mu$ m.

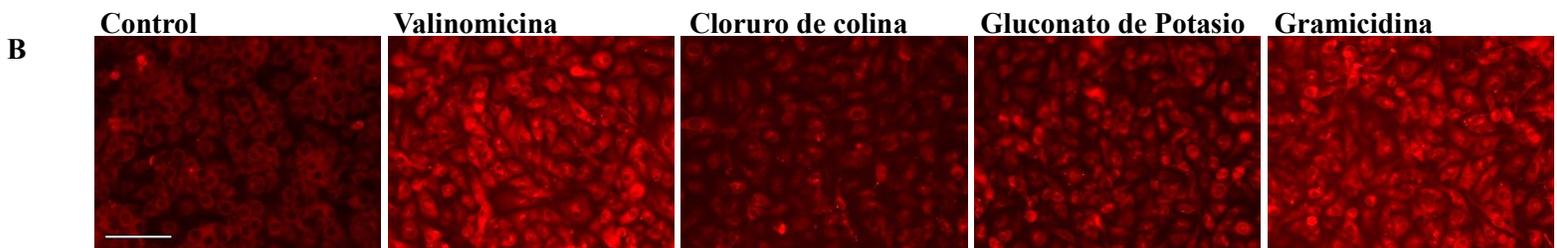
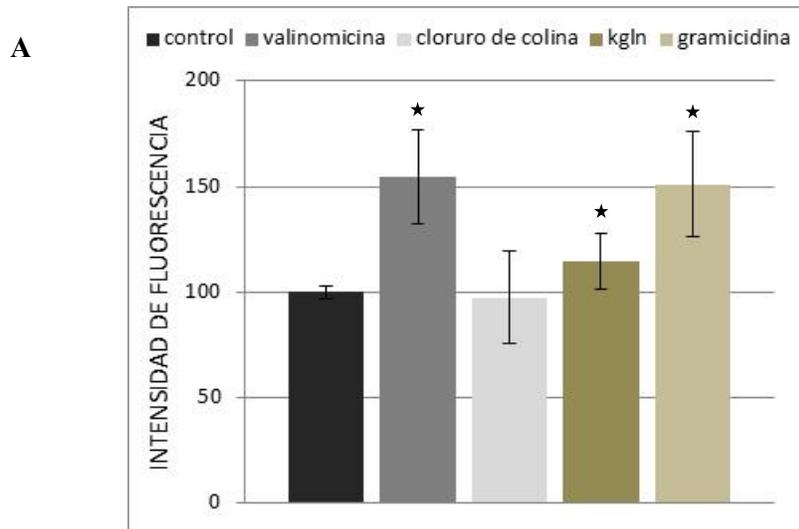
### *IV.3.2 Efecto de las soluciones de valinomicina y cloruro de colina sobre el potencial de membrana plasmática en células B16F1*

Con el propósito de poner en evidencia cambios en el potencial de membrana plasmática en B16F1 se empleó el mismo procedimiento que el utilizado en BAEC. A modo de control se incluye además para el estudio las soluciones despolarizantes de gluconato de potasio y gramicidina. Los resultados de la Figura 16 muestran que, como es de esperar, la intensidad de fluorescencia de oxonol V aumenta con las soluciones despolarizantes. Sin embargo, la solución de valinomicina también provoca un incremento de dicha intensidad y no se encontró diferencia significativa con la solución de cloruro de colina respecto al control. Por lo tanto, no se puede concluir que las soluciones de valinomicina y cloruro de colina provoquen hiperpolarización del PMP en las células B16F1, lo que sí ocurre en BAEC (sección IV.1.2). Esta conducta de la sonda en B16F1 difiere de la que exhiben todos los demás epitelios estudiados en nuestro laboratorio ((Chifflet et al., 2003), y resultados no publicados) y no tiene una interpretación evidente. Serían necesarios estudios con otras sondas potenciométricas u otros métodos electrofisiológicos para evaluar si la incubación con valinomicina y cloruro de colina efectivamente provocan la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática en B16F1. Características de las células tumorales B16F1, como su distinta composición iónica citosólica o lipídica de las membranas, podrían explicar el comportamiento “anómalo” del oxonol V con las soluciones de valinomicina y cloruro de colina en este tipo celular.

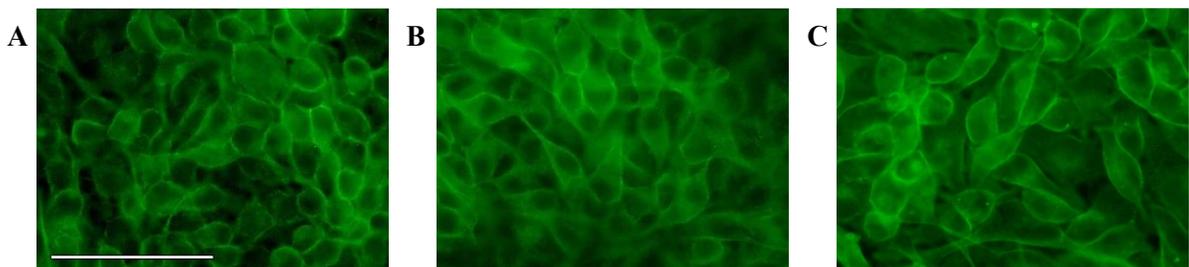
Los resultados obtenidos en BAEC permiten plantear que la hiperpolarización del PMP podría tener efectos antitumorales, ya que provocan una disminución de la migración, de la proliferación, del sprouting y de la angiogénesis. Por lo tanto, aunque no se haya podido demostrar un efecto hiperpolarizante sobre B16F1, es relevante estudiar sus

efectos sobre estas células, con el objetivo de estudiar el efecto de la valinomicina sobre la progresión tumoral en modelos *in vivo*.

Se analizó si tratamientos de 30 minutos con las soluciones de valinomicina y cloruro de colina provocan cambios fenotípicos en las células de melanoma murino. Dichos tratamientos parecen tener poco efecto sobre el citoesqueleto de actina, ya que no se evidencian diferencias en su distribución, así como tampoco se observan diferencias fenotípicas en estas células (Figura 17).



**Figura 16. Variación en la fluorescencia de oxonol V en células B16F1 en respuesta a soluciones de incubación.** **A.** Gráfica que indica la diferencia significativa (\*) respecto al control ( $p < 0.05$ ) de intensidad de fluorescencia de soluciones control, valinomicina, cloruro de colina, gluconato de potasio y gramicidina, en unidades arbitrarias (promedio  $\pm$  desvío estándar). **B.** Imágenes representativas de fluorescencia de oxonol en células B16F1 tratadas con solución control, valinomicina, cloruro de colina, gluconato de potasio y gramicidina. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .



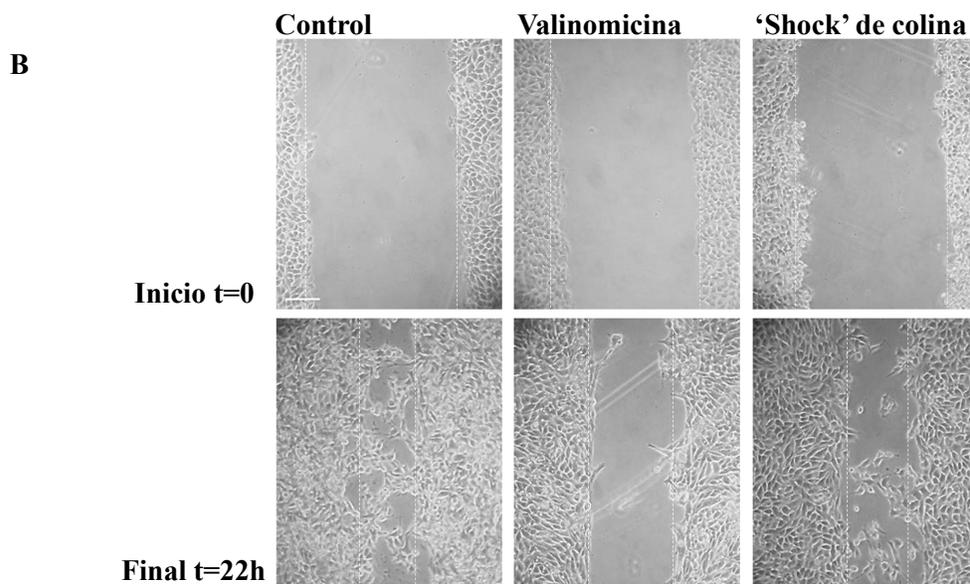
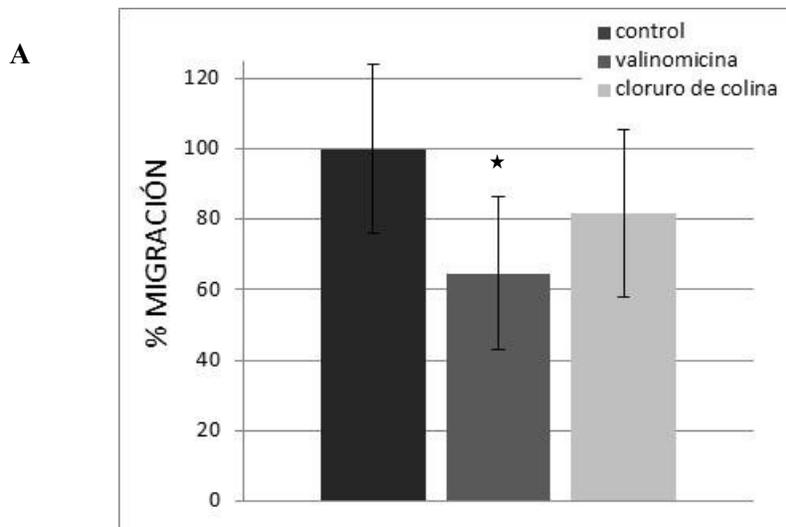
**Figura 17. Efecto de las soluciones de valinomicina y cloruro de colina sobre la distribución de la actina.** Monocapas de B16F1 incubadas durante 30 minutos en solución **(A)** control, con **(B)** valinomicina y con **(C)** cloruro de colina. Tinción con faloidina FITC para revelar la actina-F. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

### *IV.3.3 Efecto de la valinomicina y cloruro de colina sobre la migración y proliferación celular en B16F1*

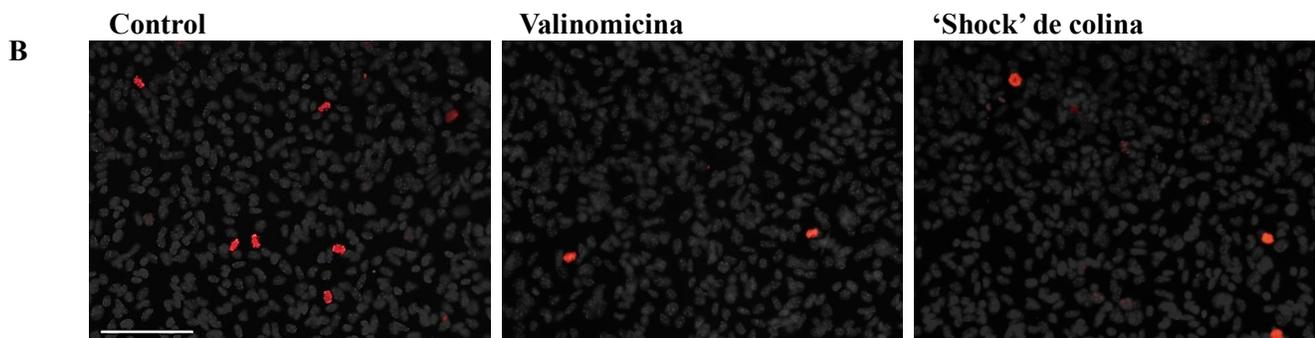
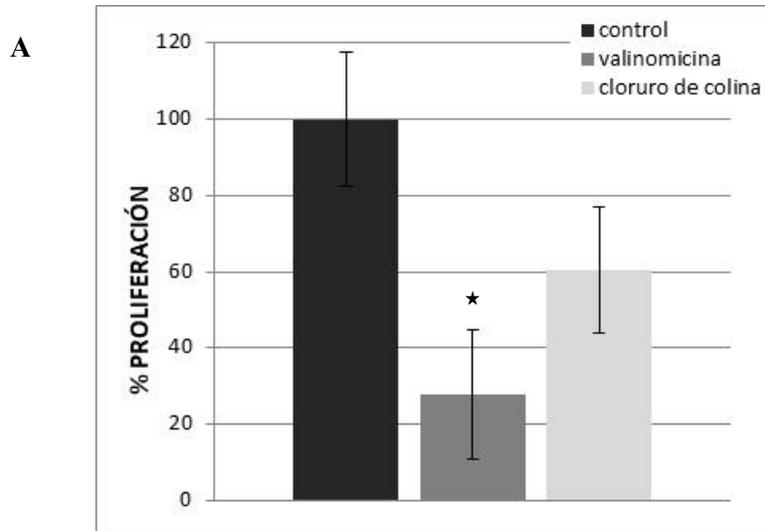
En las secciones precedentes se mostró que los tratamientos con valinomicina y cloruro de colina provocan una redistribución de la actina hacia la periferia celular en BAEC, y que este hecho podría ser la causa de una mayor estabilidad de las uniones célula-célula. A su vez dicha estabilidad podría ser una de las causas de la inhibición en la velocidad de migración e índice de proliferación celular. A pesar de no haberse encontrado modificaciones fenotípicas o en la distribución de actina en las células de melanoma murino, se exploró si el tratamiento con dichas soluciones podría producir cambios en la velocidad de migración y de proliferación celular en monocapas de B16F1. Se realizaron estos experimentos con el objetivo de poder interpretar lo que ocurre con las células tumorales cuando se adiciona la solución de valinomicina en los estudios *in vivo*.

Los resultados obtenidos indicaron una disminución en la velocidad de migración celular por el tratamiento con la solución de valinomicina de 46% con respecto al control (Figura 18). El tratamiento con 'shock' de colina no presentó diferencias significativas en el porcentaje de migración con respecto al control.

La proliferación celular se determinó utilizando imágenes de inmunofluorescencia, calculando el porcentaje de células positivas para el marcador de mitosis luego de incubar por 24 horas con las soluciones de valinomicina y cloruro de colina. Se encontró que el tratamiento con valinomicina provoca inhibición de la proliferación en un 72%, mientras que el tratamiento con cloruro de colina no presenta diferencias significativas con respecto al control (Figura 19).



**Figura 18. Efecto de la valinomicina y cloruro de colina sobre la velocidad de migración celular.** Se determinó la velocidad de migración midiendo la superficie sin células al inicio y al final del experimento. **A.** Gráfica de porcentaje de migración de monocapas tratadas con soluciones control, valinomicina y 'shock' de colina. Se grafican los promedios  $\pm$  desvío estándar. El \* indica diferencia significativa respecto al control ( $p < 0.05$ ). **B.** Fotografías en microscopio de contraste de fase que muestran la herida al inicio y luego de migrar durante 22 horas, para los distintos tratamientos. Barra: 100  $\mu$ m.



**Figura 19. Efecto de la valinomicina y cloruro de colina sobre la proliferación celular.** Se determinó el índice de proliferación calculando el porcentaje de células positivas para el marcador de mitosis anti-histona H3. **A.** Gráfica de índice mitótico de monocapas tratadas con solución control y soluciones de valinomicina y cloruro de colina. Se grafican los promedios  $\pm$  desvío estándar. El \* indica diferencia significativa respecto al control ( $p < 0.05$ ). **B.** Imágenes representativas para los distintos tratamientos de monocapas de B16F1 donde se observan las células marcadas con el anticuerpo en rojo y los núcleos marcados con Hoechst 33258 en gris. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

#### *IV.4 Progresión tumoral en modelo de melanoma murino*

Los resultados de las secciones precedentes, mostraron que los tratamientos con valinomicina provocan una inhibición en la angiogénesis, en modelos *in vitro* e *in vivo*, y una inhibición en la velocidad de migración y proliferación en B16F1. Estos resultados son la base del estudio del efecto que provoca la solución de valinomicina sobre la progresión tumoral en modelos *in vivo*. El modelo elegido para dicho estudio es melanomas implantados en ratones para evaluar la progresión tumoral.

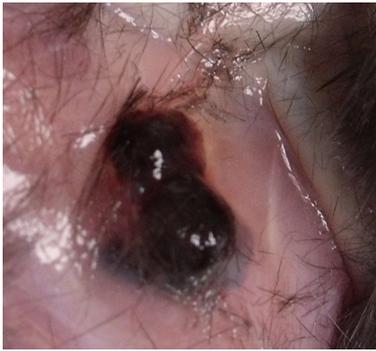
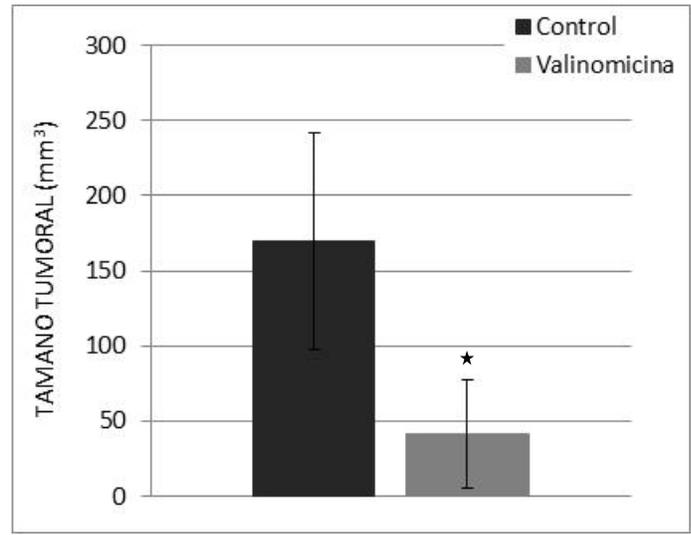
Para el estudio de agentes oncolíticos en modelos animales se utilizan diversos parámetros. De acuerdo a su estrategia experimental distintos investigadores miden: la sobrevivencia del animal, el tamaño tumoral (durante o al finalizar el experimento), la necrosis en el tejido tumoral, el índice mitótico tumoral, la angiogénesis o vascularización tumoral, entre otros. Para cumplir el objetivo de evaluar si existen diferencias en la progresión tumoral con el tratamiento de valinomicina, en este trabajo se midió el tamaño promedio de los tumores al final del experimento, el índice de mitosis de las células tumorales y la densidad vascular.

En la Figura 20 se muestra una fotografía representativa de un tumor justo antes de ser extirpado. Sus características fenotípicas coinciden con lo reportado en la bibliografía, con apariencia brillante, suave y de color negro oscuro (Rose et al., 1999). El tamaño de los tumores fue medido, utilizando la fórmula:  $\text{largo} \times \text{ancho}^2 \times \pi/6$ , como se describe en Metodología. Los resultados obtenidos muestran que el crecimiento tumoral de los tumores tratados con la solución de valinomicina fue enlentecido, llegando únicamente a un promedio de  $44 \text{ mm}^3$  comparado con los  $170 \text{ mm}^3$  del grupo control (Figura 20). Esto representa una inhibición de 74% en el tamaño tumoral en el grupo tratado. Si bien hay diferencias significativas entre los grupos control y valinomicina, la dispersión es muy grande. Esto podría deberse a, que además de ser un modelo animal en que ya hay diferencias biológicas, un tamaño muestral relativamente chico, pequeñas diferencias en

el inóculo de las células tumorales, o un tamaño tumoral no lo suficientemente grande, entre otras cosas.

En los ensayos *in vitro* observamos que la solución de valinomicina inhibe la migración y proliferación tanto en las BAEC como en las células B16F1. A su vez, en los ensayos en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo dicha solución inhibe la angiogénesis. Por lo tanto, el enlentecimiento en el crecimiento tumoral, podría ser causado por una inhibición en la angiogénesis, una disminución proliferativa de las células tumorales, o una combinación de ambas hipótesis.

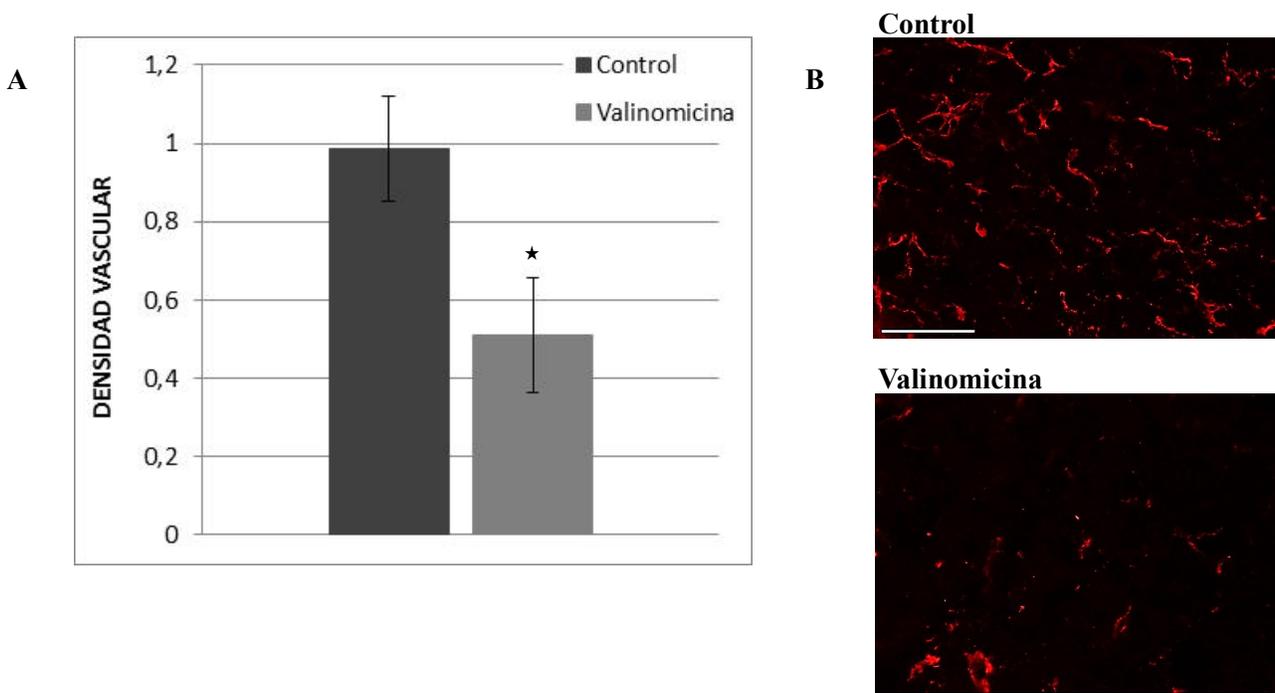
Para evaluar si la angiogénesis se encuentra disminuida en los tratamientos con valinomicina, se determinó la densidad vascular en las secciones centrales de los tumores.

**A****B**

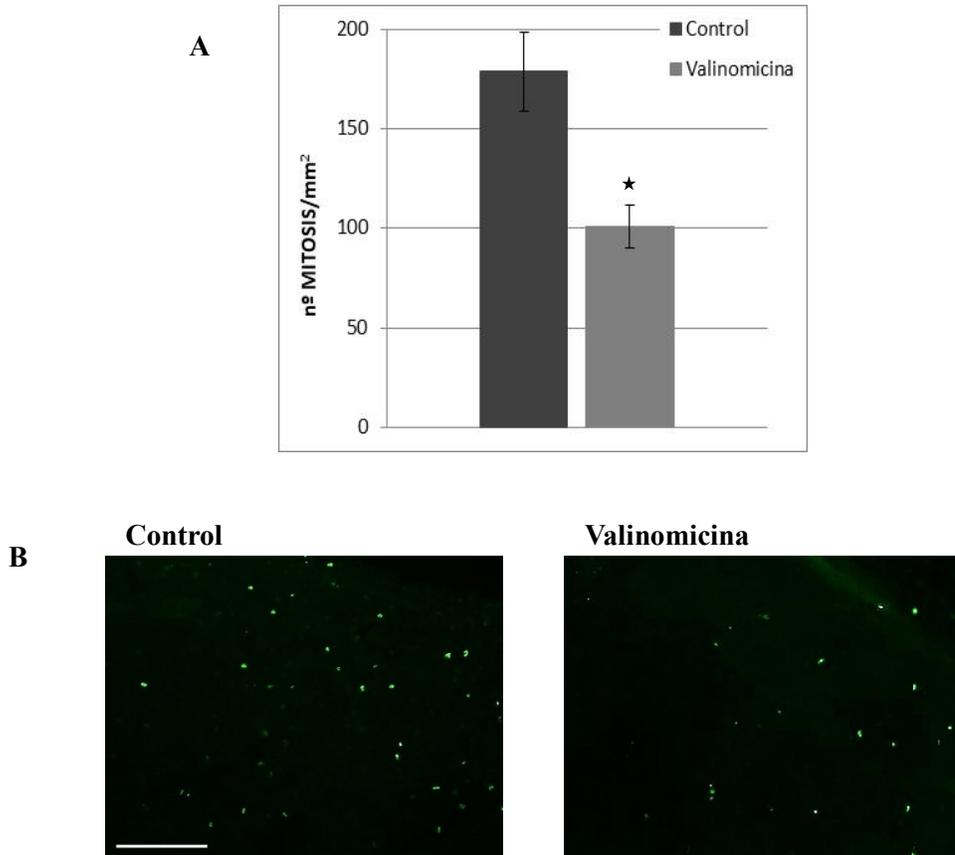
**Figura 20. Efecto de la solución de valinomicina sobre el tamaño tumoral.** Los ratones se sacrificaron 12 días luego de implantar las células tumorales. Los tumores se extirparon y midieron según la fórmula largo x ancho<sup>2</sup> x  $\pi/6$ . **A.** Fotografía representativa de un tumor justo antes de ser extirpado. Se observa su apariencia brillante, suave y su color negro característico. **B.** Gráfica de tamaño tumoral de ratones tratados con solución control y de valinomicina. Se grafican los promedios  $\pm$  desvío estándar (n=10). El \* indica diferencia significativa respecto al control (p<0.05).

Como se describe en Metodología, se evaluaron la cantidad de pixeles positivos para el factor de Von Willebrand en una zona definida previamente, normalizados por la superficie de la sección. Si bien delimitar una zona podría inducir a errores de medida, por estar los vasos sanguíneos distribuidos uniformemente a lo largo del corte, encontramos que la elección de la forma en cruz es la más reproducible para comparar en todos los tumores. En la Figura 21 se muestran los resultados que expresan una disminución de la vascularización en los tumores de los ratones tratados con valinomicina. Dicho tratamiento provoca una disminución en la densidad vascular de 48%. En la figura 21B se presentan imágenes representativas de las secciones tumorales donde se destaca en rojo el endotelio vascular.

Para determinar el índice de mitosis de las células tumorales se contaron las células proliferativas marcadas con el anticuerpo anti-HistonaH3. Por estar concentradas en la periferia del tumor, se midió únicamente el área de un campo visual del microscopio en los cuatro ejes del tumor (Figura 4, esquema B). En la Figura 22 se pueden ver imágenes representativas del grupo control y tratado, donde se observan en verde los núcleos proliferativos. También se destaca en dichas imágenes, la distribución de los núcleos proliferativos sobre el borde del tumor (el borde superior derecho de la imagen). Los resultados obtenidos evidencian diferencias significativas en el índice de mitosis en el grupo tratado con respecto al control (Figura 22). El número de mitosis fue en promedio de 179 y 101 por  $\text{mm}^2$ , para el grupo con solución control y de valinomicina, respectivamente, y por lo tanto el tratamiento con valinomicina disminuye la cantidad de mitosis en un 43%.



**Figura 21. Efecto de la solución de valinomicina sobre la densidad vascular en melanomas murinos.** Los tumores de los grupos control y tratado se fijaron en PAF 4%, congelaron en tissuetek y se cortaron secciones de 10  $\mu$ m. Las secciones centrales se incubaron con el factor de Von Willebrand para visualizar los vasos sanguíneos. **A.** Gráfica de densidad vascular que muestra diferencias significativas del grupo tratado con respecto al control. Se grafican los promedios  $\pm$  desvío estándar (n=5). El \* indica diferencia significativa respecto al control (p<0.05). **B.** Imágenes representativas de las secciones centrales de los tumores con inmunofluorescencia de Von Willebrand. Se observa en rojo la tinción positiva que marca el endotelio vascular. Barra: 100  $\mu$ m.



**Figura 22. Efecto de la solución de valinomicina sobre el índice de mitosis en melanomas murinos.** Los tumores de los grupos control y tratado se fijaron en PAF 4%, congelaron en tissuetek y se cortaron secciones de 10  $\mu\text{m}$ . Las secciones centrales se incubaron con el anticuerpo anti-histonaH3 para revelar la mitosis celular. **A.** Se contaron los núcleos marcados por campo ( $0.2 \text{ mm}^2$ ) y se multiplicó por 5 para expresar los resultados por  $\text{mm}^2$ . La gráfica muestra diferencias significativas del grupo tratado con respecto al control. Se grafican los promedios  $\pm$  desvío estándar ( $n=5$ ). El \* indica diferencia significativa respecto al control ( $p<0.05$ ). **B.** Imágenes representativas de las secciones centrales de los tumores con inmunofluorescencia de anti-histonaH3. Se observa en verde la tinción positiva que marca a las células proliferativas. Barra: 100  $\mu\text{m}$

## V. Discusión

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que los cambios en el PMP provocan una remodelación en el citoesqueleto de actina y modulan la estabilidad de las uniones celulares (Chifflet et al., 2004; Chifflet et al., 2003; Nin et al., 2009). También demostramos que la hiperpolarización del PMP provoca la compactación del citoesqueleto de actina hacia la periferia celular y determina un aumento en la estabilidad de las uniones celulares en monocapas confluentes de células de endotelio de córnea en cultivo (Nin et al., 2009). En este trabajo encontramos que soluciones de valinomicina y cloruro de colina, que determinan una hiperpolarización del PMP provocan una disminución de la velocidad de migración y de la proliferación en células de endotelio vascular y células tumorales *in vitro* y que retrasan la angiogénesis y la progresión tumoral *in vivo*.

Nuestra investigación comenzó con el estudio de las soluciones hiperpolarizantes en BAEC, comprobándose que en tratamientos cortos de 30 minutos se reproduce el resultado encontrado anteriormente en nuestro laboratorio en endotelio de córnea de bovino (Nin et al., 2009). Es decir, que los tratamientos con las soluciones de valinomicina y cloruro de colina hiperpolarizan el potencial de membrana plasmática en BAEC, y que dicha hiperpolarización tiene efecto en la redistribución del citoesqueleto de actina hacia la periferia celular. A su vez, se encontró el mencionado efecto sobre el citoesqueleto y un aumento en la estabilidad de las uniones celulares, en tratamientos de 24 horas a pesar de ya no registrarse cambios en el PMP a largo plazo. Esto indicaría que los cambios tempranos y transitorios provocados por la hiperpolarización del PMP sobre la organización del citoesqueleto de actina y la composición de las uniones son duraderos.

Encontramos que la HPMP inhibe algunos de los procesos fundamentales en la angiogénesis como la generación de 'sprouting' y la migración y proliferación celular en

células de endotelio de aorta en cultivo. Aquí proponemos que uno de los mecanismos que intervienen en dicho efecto es que la hiperpolarización del PMP compacta los microfilamentos de actina sobre la periferia celular creando unas uniones adherentes más fuertes y estables, retrasando los eventos mencionados de la angiogénesis. De acuerdo con esto, se ha demostrado que los microfilamentos de actina cumplen un rol fundamental en generar la fuerza necesaria para la migración (Lee and Gotlieb, 2003) y que las uniones adherentes experimentan un proceso dinámico de ‘treadmilling’ durante la migración colectiva (Peglion et al., 2014). Además, se ha visto que el potencial proliferativo está inversamente asociado con la maduración de la unión adherente (Zhu et al., 2008).

Para evaluar la habilidad de la valinomicina, utilizado como agente hiperpolarizante, sobre el proceso angiogénico *in vivo*, se utilizó un modelo adaptado de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (West et al., 2001) y se observó que la valinomicina reduce la formación de nuevos vasos sanguíneos. Este efecto fue observado en condiciones que no afectaron en forma ostensible el desarrollo del embrión. Por lo tanto, los resultados obtenidos con este modelo experimental son consistentes con los obtenidos en los experimentos *in vitro*. En efecto, ambos sugieren que la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática inhibe la angiogénesis.

Si bien no se logró tener evidencia de que las soluciones hiperpolarizantes provoquen la hiperpolarización en B16F1, en virtud de que el objetivo final de este trabajo fue el de evaluar el efecto de las soluciones hiperpolarizantes sobre la progresión tumoral *in vivo*, se estudió, al igual que en BAEC, el efecto de dichas soluciones sobre la migración y proliferación celular en B16F1 *in vitro* para evaluar su comportamiento. De haber determinado un aumento en la velocidad de migración y proliferación celular, estos tratamientos no hubieran sido prometedores para los fines de esta tesis. Sin embargo, los resultados fueron similares a los obtenidos en BAEC, provocando una inhibición en la

velocidad de migración y proliferación celular. El hecho de que las células B16F1 no tengan el fenotipo epitelial típico, con uniones celulares bien constituidas y citoesqueleto subyacente, sugiere que la estabilidad de las uniones no sería el mecanismo de acción principal en este caso.

Para continuar con el estudio de la angiogénesis y la progresión tumoral, se realizaron experimentos en que se implantaron células tumorales B16F1 en ratones induciéndoles un melanoma. En este trabajo se encontró que el tratamiento con la solución de valinomicina induce una disminución en la densidad vascular, una reducción significativa de la proliferación en las células tumorales y retrasa la progresión tumoral *in vivo*. El melanoma B16F1 es altamente dependiente de la angiogénesis, ya que si ésta se detiene, se suprime la progresión tumoral *in vivo* (Gorrin-Rivas et al., 2000). El efecto anti-angiogénico provocado por la solución de valinomicina sugiere una explicación plausible para la reducción en el crecimiento tumoral en los ratones *in vivo*. A su vez, la reducción de la proliferación de las células tumorales también sugiere una participación en la inhibición del crecimiento tumoral. Aunque no se pudo demostrar que la solución de valinomicina provoca la hiperpolarización del potencial de membrana plasmática en las células tumorales, los resultados obtenidos en las células tumorales se correlacionan con los resultados obtenidos cuando se hiperpolariza el PMP en el endotelio vascular ya que disminuye la migración y proliferación celular. Además concuerda con distintas evidencias experimentales de la existencia de potenciales de membrana plasmática menores en las células tumorales con respecto a las normales (Sundelacruz et al., 2009) y que sugieren que estos cambios podrían estar involucrados en el crecimiento tumoral.

En conjunto, nuestro trabajo proporciona evidencia experimental de que la administración peritumoral de una solución de valinomicina causa una inhibición de la angiogénesis y la progresión tumoral *in vitro* e *in vivo* y por lo tanto podría ser de utilidad para la terapia contra el cáncer.

## VI. Bibliografía

- Akaike, N., and N. Harata. 1994. Nystatin perforated patch recording and its applications to analyses of intracellular mechanisms. *Jpn J Physiol.* 44:433-73.
- Aragon-Sanabria, V., S.E. Pohler, V.J. Eswar, M. Bierowski, E.W. Gomez, and C. Dong. 2017. VE-Cadherin Disassembly and Cell Contractility in the Endothelium are Necessary for Barrier Disruption Induced by Tumor Cells. *Sci Rep.* 7:45835.
- Augustin-Voss, H.G., A.K. Voss, and B.U. Pauli. 1993. Senescence of aortic endothelial cells in culture: effects of basic fibroblast growth factor expression on cell phenotype, migration, and proliferation. *J Cell Physiol.* 157:279-88.
- Barritault, D., J. Plouet, J. Courty, and Y. Courtois. 1982. Purification, characterization, and biological properties of the eye-derived growth factor from retina: analogies with brain-derived growth factor. *J Neurosci Res.* 8:477-90.
- Bashford, C.L., and J.C. Smith. 1979. The use of optical probes to monitor membrane potential. *Methods Enzymol.* 55:569-86.
- Bertocchi, C., M. Vaman Rao, and R. Zaidel-Bar. 2012. Regulation of Adherens Junction Dynamics by Phosphorylation Switches. *Journal of Signal Transduction.* 2012:14.
- Binggeli, R., and I.L. Cameron. 1980. Cellular potentials of normal and cancerous fibroblasts and hepatocytes. *Cancer Res.* 40:1830-5.
- Blackiston, D.J., K.A. McLaughlin, and M. Levin. 2009. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell Cycle.* 8:3527-36.
- Bruner, H.C., and P.W.B. Derksen. 2018. Loss of E-Cadherin-Dependent Cell-Cell Adhesion and the Development and Progression of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 10.
- Cairns, R., R. Khokha, and R. Hill. 2003. Cairns, R. A. , Khokha, R. & Hill, R. P. Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: An integrated view. *Curr. Mol. Med.* 3, 659-671. 659-71 pp.
- Callies, C., J. Fels, I. Liashkovich, K. Kliche, P. Jeggle, K. Kusche-Vihrog, and H. Oberleithner. 2011. Membrane potential depolarization decreases the stiffness of vascular endothelial cells. *J Cell Sci.* 124:1936-42.
- Canfield, A.E., and A.M. Schor. 1995. Evidence that tenascin and thrombospondin-1 modulate sprouting of endothelial cells. *J Cell Sci.* 108 ( Pt 2):797-809.
- Carmeliet, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 6:389-395.
- Cavallaro, U., and G. Christofori. 2004. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 4:118.
- Cavallaro, U., S. Liebner, and E. Dejana. 2006. Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Exp Cell Res.* 312:659-67.
- Cone, C.D., Jr. 1971. Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. *J Theor Biol.* 30:151-81.
- Conti, C.J. 2010. 14.16 - Mechanisms of Tumor Progression A2 - McQueen, Charlene A. *In Comprehensive Toxicology (Second Edition).* Elsevier, Oxford. 335-347.
- Cooper, G.M. 1995. *Oncogenes.* Jones & Bartlett Learning.
- Chantome, A., A. Girault, M. Potier, C. Collin, P. Vaudin, J.C. Pages, C. Vandier, and V. Joulin. 2009. KCa2.3 channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility. *Exp Cell Res.* 315:3620-30.
- Chernet, B.T., and M. Levin. 2013. Transmembrane voltage potential is an essential cellular parameter for the detection and control of tumor development in a *Xenopus* model. *Dis Model Mech.* 6:595-607.
- Chernet, B.T., and M. Levin. 2014. Transmembrane voltage potential of somatic cells controls oncogene-

- mediated tumorigenesis at long-range. *Oncotarget*. 5:3287-3306.
- Chifflet, S., V. Correa, V. Nin, C. Justet, and J.A. Hernandez. 2004. Effect of membrane potential depolarization on the organization of the actin cytoskeleton of eye epithelia. The role of adherens junctions. *Exp Eye Res*. 79:769-77.
- Chifflet, S., and J.A. Hernandez. 2012. The plasma membrane potential and the organization of the actin cytoskeleton of epithelial cells. *Int J Cell Biol*. 2012:121424.
- Chifflet, S., J.A. Hernandez, and S. Grasso. 2005. A possible role for membrane depolarization in epithelial wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol*. 288:C1420-30.
- Chifflet, S., J.A. Hernández, S. Grasso, and A. Cirillo. 2003. Nonspecific Depolarization of the Plasma Membrane Potential Induces Cytoskeletal Modifications of Bovine Corneal Endothelial Cells in Culture. *Experimental Cell Research*. 282:1-13.
- Dall'Asta, V., R. Gatti, G. Orlandini, P.A. Rossi, B.M. Rotoli, R. Sala, O. Bussolati, and G.C. Gazzola. 1997. Membrane potential changes visualized in complete growth media through confocal laser scanning microscopy of bis-oxonol-loaded cells. *Exp Cell Res*. 231:260-8.
- Defamie, N., A. Chepied, and M. Mesnil. 2014. Connexins, gap junctions and tissue invasion. *FEBS Lett*. 588:1331-8.
- Dejana, E. 1996. Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 98:1949-1953.
- Dejana, E., E. Tournier-Lasserre, and B.M. Weinstein. 2009. The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications. *Developmental Cell*. 16:209-221.
- Deryugina, E.I., and J.P. Quigley. 2008. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochemistry and cell biology*. 130:1119-1130.
- Dudek, S.M., and J.G. Garcia. 2001. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol (1985)*. 91:1487-500.
- Dusek, R.L., and L.D. Attardi. 2011. Desmosomes: new perpetrators in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 11:317-23.
- Egami, K., T. Murohara, T. Shimada, K.-i. Sasaki, S. Shintani, T. Sugaya, M. Ishii, T. Akagi, H. Ikeda, T. Matsuishi, and T. Imaizumi. 2003. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *Journal of Clinical Investigation*. 112:67-75.
- Ehrenberg, B., V. Montana, M.D. Wei, J.P. Wuskell, and L.M. Loew. 1988. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J*. 53:785-94.
- Epps, D.E., M.L. Wolfe, and V. Groppi. 1994. Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol (Dibac4(3)) in model systems and cells. *Chem Phys Lipids*. 69:137-50.
- Esch, F., A. Baird, N. Ling, N. Ueno, F. Hill, L. Denoroy, R. Klepper, D. Gospodarowicz, P. Bohlen, and R. Guillemin. 1985a. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82:6507-11.
- Esch, F., N. Ueno, A. Baird, F. Hill, L. Denoroy, N. Ling, D. Gospodarowicz, and R. Guillemin. 1985b. Primary structure of bovine brain acidic fibroblast growth factor (FGF). *Biochem Biophys Res Commun*. 133:554-62.
- Evans, F. 2011. Algunos aspectos celulares de los procesos de cicatrización de heridas en el endotelio vascular. *In Laboratorio de Bioquímica Celular, Facultad de Medicina, UdeLaR*.
- Folkman, J. 2006. Angiogenesis. *Annu Rev Med*. 57:1-18.
- Gajdusek, C.M., Z. Luo, and M.R. Mayberg. 1993. Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta-1: Synergistic mediators of angiogenesis in vitro. *Journal of Cellular Physiology*.

157:133-144.

- Gonzalez, A.M., M. Berry, P.A. Maher, A. Logan, and A. Baird. 1995. A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain. *Brain Res.* 701:201-26.
- Goodwin, A.M. 2007. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvascular research.* 74:172-183.
- Gorrin-Rivas, M.J., S. Arij, M. Furutani, M. Mizumoto, A. Mori, K. Hanaki, M. Maeda, H. Furuyama, Y. Kondo, and M. Imamura. 2000. Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 6:1647-54.
- Herzig, M., F. Savarese, M. Novatchkova, H. Semb, and G. Christofori. 2007. Tumor progression induced by the loss of E-cadherin independent of beta-catenin/Tcf-mediated Wnt signaling. *Oncogene.* 26:2290-8.
- Ivanov, A.I. 2008. Actin motors that drive formation and disassembly of epithelial apical junctions. *Front Biosci.* 13:6662-81.
- Kapus, A., and P. Janmey. 2013. Plasma membrane--cortical cytoskeleton interactions: a cell biology approach with biophysical considerations. *Compr Physiol.* 3:1231-81.
- Klapperstuck, T., D. Glanz, M. Klapperstuck, and J. Wohlrab. 2009. Methodological aspects of measuring absolute values of membrane potential in human cells by flow cytometry. *Cytometry A.* 75:593-608.
- Komarova, Y., and A. Malik. 2010. Regulation of Endothelial Permeability via Paracellular and Transcellular Transport Pathways. 463-93 pp.
- Kukkonen, J.P., R. Hautala, and K.E. Akerman. 1996. Muscarinic depolarization of SH-SY5Y human neuroblastoma cells as determined using oxonol V. *Neurosci Lett.* 212:57-60.
- Langenkamp, E., F.M. vom Hagen, P.J. Zwiers, H.E. Moorlag, J.P. Schouten, H.-P. Hammes, A.S.H. Gouw, and G. Molema. 2011. Tumor Vascular Morphology Undergoes Dramatic Changes during Outgrowth of B16 Melanoma While Proangiogenic Gene Expression Remains Unchanged. *ISRN Oncology.* 2011:14.
- Leckband, D.E., and J. de Rooij. 2014. Cadherin adhesion and mechanotransduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 30:291-315.
- Lee, J., and A. Gotlieb. 2003. Understanding the role of the cytoskeleton in the complex regulation of the endothelial repair. *Histology and histopathology.* 18:879-887.
- Lepple-Wienhues, A., S. Berweck, M. Bohmig, C.P. Leo, B. Meyling, C. Garbe, and M. Wiederholt. 1996. K<sup>+</sup> channels and the intracellular calcium signal in human melanoma cell proliferation. *J Membr Biol.* 151:149-57.
- Levin, M. 2007. Large-scale biophysics: ion flows and regeneration. *Trends in Cell Biology.* 17:261-270.
- Levin, M. 2012. Molecular bioelectricity in developmental biology: new tools and recent discoveries: control of cell behavior and pattern formation by transmembrane potential gradients. *Bioessays.* 34:205-17.
- Lobikin, M., B. Chernet, D. Lobo, and M. Levin. 2012. Resting potential, oncogene-induced tumorigenesis, and metastasis: the bioelectric basis of cancer in vivo. *Phys Biol.* 9:065002.
- Marino, A.A., I.G. Iliev, M.A. Schwalke, E. Gonzalez, K.C. Marler, and C.A. Flanagan. 1994. Association between cell membrane potential and breast cancer. *Tumour Biol.* 15:82-9.
- Martin, T., L. Ye, S. Aj, J. Lane, and W. Jiang. 2013. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular perspective. 135-168 pp.
- Martin, T.A., G. Watkins, R.E. Mansel, and W.G. Jiang. 2004. Hepatocyte growth factor disrupts tight junctions in human breast cancer cells. *Cell Biol Int.* 28:361-71.
- Mentzel, T., L.F. Brown, H.F. Dvorak, C. Kuhn, K.J. Stiller, D. Katenkamp, and C.D.M. Fletcher. 2001. The association between tumour progression and vascularity in myxofibrosarcoma and

- myxoid/round cell liposarcoma. *Virchows Archiv*. 438:13-22.
- Montesano, R., J.D. Vassalli, A. Baird, R. Guillemin, and L. Orci. 1986. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:7297-301.
- Mori, S., V. Tran, K. Nishikawa, T. Kaneda, Y. Hamada, N. Kawaguchi, M. Fujita, Y.K. Takada, N. Matsuura, M. Zhao, and Y. Takada. 2013. A Dominant-Negative FGF1 Mutant (the R50E Mutant) Suppresses Tumorigenesis and Angiogenesis. *PLOS ONE*. 8:e57927.
- Ngo, T., E. Nagamori, T. Shimizu, T. Okano, M. Taya, and M. Kino-oka. 2014. In Vitro Models for Angiogenesis Research: A Review. 37-45 pp.
- Nin, V., J.A. Hernandez, and S. Chifflet. 2009. Hyperpolarization of the plasma membrane potential provokes reorganization of the actin cytoskeleton and increases the stability of adherens junctions in bovine corneal endothelial cells in culture. *Cell Motil Cytoskeleton*. 66:1087-99.
- Ormerod, M.G. 2000. Flow Cytometry. A Practical Approach. *Oxford University Press*. 3rd Edition.
- Pchelintseva, E., and M.B.A. Djamgoz. 2017. Mesenchymal stem cell differentiation: Control by calcium-activated potassium channels.
- Peglion, F., F. Llense, and S. Etienne-Manneville. 2014. Adherens junction treadmill during collective migration. *Nat Cell Biol*. 16:639-651.
- Perez Garcia, M.T., P. Ciudad, and J.R. Lopez-Lopez. 2017. Review on "The secret life of ion channels: Kv1.3 potassium channels and cell proliferation". *Am J Physiol Cell Physiol*:ajpcell.00136.2017.
- Perl, A.K., P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb, and G. Christofori. 1998. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*. 392:190-3.
- Pollard, T.D., L. Blanchoin, and R.D. Mullins. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 29:545-76.
- Prasain, N., and T. Stevens. 2009. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res*. 77:53-63.
- Prevarskaya, N., R. Skryma, and Y. Shuba. 2010. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med*. 16:107-21.
- Prewett, M., J. Huber, Y. Li, A. Santiago, W. O'Connor, K. King, J. Overholser, A. Hooper, B. Pytowski, L. Witte, P. Bohlen, and D.J. Hicklin. 1999. Antivascular Endothelial Growth Factor Receptor (Fetal Liver Kinase 1) Monoclonal Antibody Inhibits Tumor Angiogenesis and Growth of Several Mouse and Human Tumors. *Cancer Research*. 59:5209-5218.
- Rao, V.R., M. Perez-Neut, S. Kaja, and S. Gentile. 2015. Voltage-gated ion channels in cancer cell proliferation. *Cancers (Basel)*. 7:849-75.
- Rose, M.L., J. Madren, H. Bunzendahl, and R.G. Thurman. 1999. Dietary glycine inhibits the growth of B16 melanoma tumors in mice. *Carcinogenesis*. 20:793-798.
- Schnittler, H., M. Taha, M.O. Schnittler, A.A. Taha, N. Lindemann, and J. Seebach. 2014. Actin filament dynamics and endothelial cell junctions: the Ying and Yang between stabilization and motion. *Cell Tissue Res*. 355:529-43.
- Simons, K., and S.D. Fuller. 1985. Cell surface polarity in epithelia. *Annual review of cell biology*. 1:243-288.
- Staton, C.A., S.M. Stribbling, S. Tazzyman, R. Hughes, N.J. Brown, and C.E. Lewis. 2004. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *International Journal of Experimental Pathology*. 85:233-248.
- Stockmann, C., A. Doedens, A. Weidemann, N. Zhang, N. Takeda, J.I. Greenberg, D.A. Cheresch, and R.S. Johnson. 2008. Deletion of Vascular Endothelial Growth Factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature*. 456:814-818.
- Sundelacruz, S., M. Levin, and D.L. Kaplan. 2009. Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev*. 5:231-46.
- Szaszi, K., G. Sirokmany, C. Di Ciano-Oliveira, O.D. Rotstein, and A. Kapus. 2005. Depolarization induces

- Rho-Rho kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in kidney tubular cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 289:C673-85.
- Thomas, K.A., and G. Gimenez-Gallego. 1986. Fibroblast growth factors: broad spectrum mitogens with potent angiogenic activity. *Trends in Biochemical Sciences.* 11:81-84.
- Tozer, G.M., C. Kanthou, and B.C. Baguley. 2005. Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer.* 5:423-435.
- Vinay Kumar, R.S.C.S.L.R. 2003. Robbins basic pathology. Seventh edition. Philadelphia, PA : Saunders, [2003] ©2003.
- Vleminckx, K., L. Vakaet, Jr., M. Mareel, W. Fiers, and F. van Roy. 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell.* 66:107-19.
- Wallez, Y., and P. Huber. 2008. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1778:794-809.
- Wang, S., Z. Melkounian, K.A. Woodfork, C. Cather, A.G. Davidson, W.F. Wonderlin, and J.S. Strobl. 1998. Evidence for an early G1 ionic event necessary for cell cycle progression and survival in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *J Cell Physiol.* 176:456-64.
- West, D.C., W.D. Thompson, P.G. Sells, and M.F. Burbridge. 2001. Angiogenesis Assays Using Chick Chorioallantoic Membrane. In *Angiogenesis Protocols.* J.C. Murray, editor. Humana Press, Totowa, NJ. 107-129.
- Wonderlin, W.F., K.A. Woodfork, and J.S. Strobl. 1995. Changes in membrane potential during the progression of MCF-7 human mammary tumor cells through the cell cycle. *J Cell Physiol.* 165:177-85.
- Wong, A.S., and B.M. Gumbiner. 2003. Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *J Cell Biol.* 161:1191-203.
- Yang, M., and W.J. Brackenbury. 2013. Membrane potential and cancer progression. *Front Physiol.* 4:185.
- Zhu, Y.-T., Y. Hayashida, A. Kheirkhah, H. He, S.Y. Chen, and S. Tseng. 2008. Characterization and Comparison of Intercellular Adherent Junctions Expressed by Human Corneal Endothelial Cells In Vivo and In Vitro. 49:3879-86.