

# Ensayo angiogénesis in vitro

Germán Alberto Téllez Ramírez, Lily Johanna Toro, Jesica Palacio, Diana Carolina Henao, Jhon Carlos Castaño Osorio

## Abstract

Angiogenesis *in vitro*: Es la formación *In vitro* de tubos capilares por células endoteliales en la matriz de una membrana basal, es un método *in vitro* poderoso para evaluar varios factores que promueven o inhiben angiogenesis. Es para definir las rutas de señalización en angiogenesis, identificando los genes reguladores de angiogenesis y caracterizando las células endoteliales del progenitor.

El ensayo puede ser hecho como primera valoración antes de una prueba costosa con animales y puede ser hecho como un proceso de alta tecnología. Este es un método *in vitro* privilegiado para evaluar reguladores angiogenicos.

La realizacion de este protocolo fue posible gracias al apoyo del departamento administrativo de ciencia tecnología e innovacion, Colciencias a traves del proyecto 111356933173 convocatoria569-2012.

**Citation:** Germán Alberto Téllez Ramírez, Lily Johanna Toro, Jesica Palacio, Diana Carolina Henao, Jhon Carlos Castaño Osorio Ensayo angiogénesis in vitro. **protocols.io**

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ju3cnyn

**Published:** 19 Oct 2017

## Materials

10µl Pipette Tips [022491504](#) by [Eppendorf](#)

Cultrex® 3-D Culture Matrix™ Reduced Growth Factor Basement Membrane Extract, PathClear® [3445-001-01](#) by [Sigma Aldrich](#)

Recombinant Human VEGF-121 (carrier-free) [583202](#) by [BioLegend](#)

Calcein, AM, cell-permeant dye [C3100MP](#) by [Thermo Fisher Scientific](#)

DMEM, powder, high glucose [12100046](#) by [Gibco - Thermo Fischer](#)

EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™) [CRL-2922](#) by [ATCC](#)

fetal bovine serum [CVFSVF0001](#) by [eurobio](#)

Basic Fibroblast Growth Factor, human (hbFGF) [11123149001](#) by [Sigma Aldrich](#)

Antibiotic Antimycotic Solution (100×), Stabilized [A5955](#) by [Sigma Aldrich](#)

Sodium Pyruvate (100 mM) [11360070](#) by [Thermo Fisher Scientific](#)

## Protocol

Descongelar el extracto de membrana basal.

### Step 1.

Pasar el extracto de membrana basal del congelador de -80°C a 4°C un día antes de realizar del ensayo.



#### REAGENTS

Cultrex® 3-D Culture Matrix™ Reduced Growth Factor Basement Membrane Extract, PathClear® [3445-001-01](#) by [Sigma Aldrich](#)



#### NOTES

**Grupo de Inmunología Molecular Universidad del Quindío** 12 Sep 2017

El extracto de membrana basal se gelifica muy fácilmente, por lo tanto es importante no calentarlo como parte del proceso de descongelación y mantenerlo en hielo mientras se pipetea en las placas de cultivo celular. Este puede ser alicuotado y congelado a -20°C o -80°C o almacenado a 4°C por pocos días. Invertir el tubo con el extracto varias veces antes de alicuotar.

Pase de células EaHy926.

### Step 2.

La células se deben sembrar hasta una confluencia de 80% (Generalmente sembrar  $5 \times 10^5$  (500.000) a  $1 \times 10^6$  (1'000.000) células por cada recipiente de 25 cm<sup>2</sup>). Medio de cultivo (DMEM 1X, Antibiotico antimicotico 1X, piruvato de sodio 1mM, suero fetal bovino 10%, factores de crecimientos para celulas endoteliales 500ng/mL)



#### REAGENTS

DMEM, powder, high glucose [12100046](#) by [Gibco - Thermo Fischer](#)

EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™) [CRL-2922](#) by [ATCC](#)

fetal bovine serum [CVFSVF0001](#) by [eurobio](#)

Sodium Pyruvate (100 mM) [11360070](#) by [Thermo Fisher Scientific](#)

Antibiotic Antimycotic Solution (100x), Stabilized [A5955](#) by [Sigma Aldrich](#)

Pituitary Extract bovine [P1167-5MG](#) by [Sigma Aldrich](#)



#### NOTES

Esta línea celular no debe exceder 12 pases. Las células deben ser pasadas al menos dos veces después de ser descongeladas de nitrógeno líquido.

Cubrir placas de 96 pozos con el extracto de membrana basal.

**Step 3.**

- Sacar un tubo de extracto de membrana basal completamente descongelado (4°C) llevar a hielo. Ubicar la placa de 96 pozos en hielo en cabina de flujo laminar. Invertir tubo con extracto de membrana basal para mezclar contenido. Adicionar **50-100 µl** de extracto en cada pozo. Agitar suavemente para que el gel se extienda en toda la superficie.
- Transferir la placa de 96 pozos a incubadora de cultivo celular y déjela a 37°C durante 30 minutos para dejar gelificar el extracto de membrana basal.

**NOTES**

**Grupo de Inmunología Molecular Universidad del Quindío** 12 Sep 2017

Evitar burbujas de aire en el extracto de membrana basal al pipetear dentro de cada pozo. Si se forman burbujas centrifugar la placa a 300 g por 10 minutos a 4°C. Asegúrese que la centrifuga este previamente enfriada a 4°C antes de centrifugar la placa con el extracto.

**Grupo de Inmunología Molecular Universidad del Quindío** 12 Sep 2017

No agitar la placa durante el tiempo de gelificación debido a que se puede generar una superficie irregular en el gel.

Adhesión celular (Células endoteliales EaHy926)

**Step 4.**

- Realizar la disgregación celular utilizando tripsina-EDTA (Gibco 25200056) hasta que la células queden desprendidas de manera individual con una viabilidad mayor del 90%.

•

brevemente:

1. Lavar las células con PBS 1X (NaCl 140mM; KCl 2,7mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,1mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8mM; pH 7,4).
2. Adicionar 500µL de tripsina -EDTA.

3. Incubar a 37°C por 5 minutos.
  4. Colectar las celulas adicionando medio de cultivo (DMEM 1X suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, antibiótico-antimicótico al 1X, piruvato de sodio a 1mM)
  5. Visualizar que las células esten disgregadas de forma individual y contar.
- Asegurarse que las células estén bien mezcladas cuando se adicionen a cada pozo ya que la densidad celular tiene un efecto en la formación de tubo.
  - Sembrar las células sobre el extracto de membrana basal ya gelificado a una concentración de 15.000 células/pozo en 50 µL/pozo (confluencia del 85 a 90%) en placas de 96 pozos en medio de cultivo sin factores de crecimiento (DMEM 1X suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 0,5%, antibiótico-antimicótico al 1X, piruvato de sodio a 1mM).

## 📌 NOTES

**Grupo de Inmunología Molecular Universidad del Quindío** 12 Sep 2017

Trabajar con las células dos o tres pases después de descongeladas.

Se adicionan el número de células por pozo necesarias para que alcancen una confluencia de 85-90%.

**No tocar** la superficie del gel cuando se adicionen las células y adicionar la suspensión celular lentamente para no dañar el material gelificado.

## Preparación y adición de controles y tratamientos a evaluar

### Step 5.

Preparar los controles como sigue para 50µL/pozo:

1. **Blanco medio de cultivo:** DMEM 1X suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 0,5%, antibiótico-antimicótico al 1X, piruvato de sodio a 1mM.
2. **Control positivo 2X factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF):** DMEM 1X suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 0,5%, antibiótico-antimicótico al 1X, piruvato de sodio a 1mM, **VEGF 80 ng/mL**.
3. **Tratamientos (#) 2X:** DMEM 1X suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 0,5%, antibiótico-antimicótico al 1X, piruvato de sodio a 1mM)+tratamiento a realizar a 2X la concentracion a utilizar.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C		1	2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9		
D												
E	Sin membrana	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
F												
G												
H												

Incubar la placa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en la incubadora de cultivo celular por un periodo de 24 horas o hasta que los resultados deseados sean adquiridos.

#### Calceína AM

##### Step 6.

Posterior a las 24 horas de incubación, adicionar 50 µL/pozo de Calceína AM (Ref. C3100MP, Invitrogen) a una concentración final en el pozo de 6 µM e incubar nuevamente por 30 minutos.

#### Conteo de tubos vasculares

##### Step 7.

- Fotografíar y contar la formación de tubos vasculares para cada uno de los pozos siguiendo un esquema consecutivo de campos a 40X hasta explorar el total del área de cada pozo usando un microscopio de fluorescencia invertido con filtro: excitación 485 nm y emisión 520 nm (EVOS H0910-9031-000).
- El conteo de tubos capilares formados se deberá realizar por 2 observadores independientemente.
- Realizar el promedio de dichas observaciones y anotar en una hoja de cálculo para posterior análisis estadístico.

#### ⊕ NOTES

**Grupo de Inmunología Molecular Universidad del Quindío** 12 Sep 2017

**Tubo vascular** : Cierre completo de células endoteliales en una sola luz.

#### Análisis estadístico

##### Step 8.

Evaluar normalidad de los datos para cada grupo de tratamientos por medio de una prueba de Shapiro-Wilk con un alfa de 0,05; una vez definida la normalidad en los datos, realizar un análisis de varianza de una vías (ANOVA) con software PRISM (GraphPad, San Diego, CA) para observar si existe

diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, también se puede hacer una comparación de medias mediante la prueba T Student comparando los tratamientos versus el control de medio de cultivo. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas para un valor de  $P < 0,05$ .