

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DEL TNF-alfa,
EN UN MODELO TIPO MONOCITO, INDUCIDAS POR
LÍNEAS DE CARCINOMA PULMONAR

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A
ARGELIA COVA PÉREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente	JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ
Vocal	ANA ESTHER AGUILAR CÁRDENAS
Secretario	PATRICIA ELVIRA BERRÓN RUÍZ
1er. Suplente	ENRIQUE ORTEGA SOTO
2do. Suplente	MÓNICA BERENICE HERAS CHAVARRÍA

Sitio donde se desarrolló el tema

Laboratorio de Cáncer Pulmonar del Departamento de Enfermedades Crónico Degenerativas,
Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de la
Secretaría de Salud.

Asesor del Tema: Dr. JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ _____

Sustentante: ARGELIA COVA PÉREZ _____

Agradecimientos...

Este trabajo está consagrado al único Ser Divino, motor de mi ser, misterio inagotable de conocimiento y Sabiduría. Él es quien me impulsa a recorrer este camino de búsqueda de la verdad, camino nada fácil pero fascinante, promotor de la libertad.

בְּרוּךְ יְהוָה אֱלֹהֵינוּ

כִּי־אֲרָאָה שָׁמַיִךְ מַעֲשֵׂי אֲצַבְעֹתֶיךָ יְרַח וְכוֹכְבֵיט אֲשֶׁר כּוֹנְנֹתָהּ

מִה־אֲנוֹשׁ כִּי־תִזְכְּרֵנוּ וּבֶן־אָדָם כִּי תִפְקֹדֵנוּ:

(Salmo 8, 4-5)

Dedicado a todas aquellas personas quienes contribuyeron a la realización de este trabajo.

A mi familia...

A mis amores eternos: Antonio Cova García y Guille Pérez Zavala, mi más profundo “silencio” de admiración y agradecimiento por su loable amor servicial e incondicional, sello indeleble grabado en mi corazón, esencia de mi ser.

A mis abuelos Carlos Cova y Rafaela Zavala por mostrarme el valor de vivir.

A mis hermanos Oswaldo, Guille, Cecy, Rafael, Jacquelin y Juan por estar siempre a mi lado.

A mis Amigos!

Hermanos del alma, quienes me brindaron el precioso regalo de la “amistad”: Danielillo Zarco, Selenita, Concepción, Abelardo (mi alma gemela), Delia, Oscar, Adriana, Manuel y Juan Carlos.

A mis compañeros del Laboratorio de Cáncer Pulmonar del INER, Dolores, Federico, Heriberto, Jaime, Armando y Hector.

A mis profesores...

De manera muy especial llevo grabado en mi mente y en mi corazón el λογος de dos personas, pilares en la formación de mi pensamiento, Carlos Amador y Carlos Huesca, quienes me introdujeron en ámbitos distintos del saber (*Fides et Ratio*).

Al Dr. Sullivan por la oportunidad de realizar este trabajo bajo su tutoría, por su invaluable amistad, por la confianza depositada en mí, por el tiempo, paciencia y conocimientos brindados.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE GRÁFICAS	vi
ABREVIATURAS	vii
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 CÁNCER	
1.1.1 Generalidades	1
1.1.2 Factores asociados al cáncer pulmonar	2
1.1.3 Tipos histológicos del cáncer pulmonar	4
1.2 SISTEMA INMUNE Y CÁNCER	
1.2.1 Generalidades	5
1.2.2 Inmunobiología del tumor	5
1.2.3 Respuesta inmune innata frente a las células tumorales	6
1.3 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA	12
1.3.1 Actividades biológicas del TNF	13
1.3.2 Molécula del TNF- α	14
1.3.3 Receptores del TNF- α	14
1.3.4 Señalización del TNF- α a través de sus receptores	17
1.3.5 Organización genómica del TNF- α	17
1.3.6 Regulación de la expresión del gen para TNF- α	19
1.3.7 Inhibidores de la expresión génica del TNF- α	20
2. ANTECEDENTES	
2.1 MECANISMOS DE EVASIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES: RELACIÓN CON EL MACRÓFAGO	
2.1.1 Generalidades	22
2.2.1 En el cáncer pulmonar	24
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. OBJETIVO	27
5. HIPÓTESIS	27
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
7. MATERIALES Y MÉTODOS	
7.1 Reactivos y anticuerpos	29
7.2 Líneas celulares	29
7.3 Condiciones de co-cultivo	30
7.4 Extracción de RNA total	30
7.5 Amplificación del RNA mensajero por RT-PCR	30
7.6 Detección de TNF- α por citometría de flujo	31

8. RESULTADOS	
8.1 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RNAm PARA TNF- α POR EL MÉTODO DE RT-PCR	
8.1.1 Condiciones experimentales	33
8.1.2 Expresión del RNAm para TNF- α en células U-937	
Efecto de la línea tumoral SK-MES-1	34
Efecto de la línea tumoral CALU-1	35
Efecto de la línea tumoral SK-LU-1	37
Efecto de la línea tumoral 3B1A	39
8.2 DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA TNF- α POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA Y CITOMETRÍA DE FLUJO	
8.2.1 Condiciones experimentales	41
8.2.2 Detección de la proteína TNF- α intracelular en monocitos U-937	
Efecto de la línea tumoral SK-MES-1	42
Efecto de la línea tumoral CALU-1	43
Efecto de la línea tumoral SK-LU-1	44
Efecto de la línea tumoral 3B1A	45
8.2.3 Detección de la proteína TNF- α de membrana en monocitos U-937	
Efecto de la línea tumoral SK-MES-1	46
Efecto de la línea tumoral 3B1A	47
9. DISCUSIÓN	49
10. CONCLUSIONES	55
11. BIBLIOGRAFÍA	56
12. ANEXOS	
12.1 ANEXO A: Señalización del TNF- α a través de sus receptores	65
12.2 ANEXO B: Regulación de la expresión del gen para TNF- α	69
12.3 ANEXO C: Inhibidores de la expresión génica del TNF- α	73
12.4 ANEXO D: Estimulación celular (LPS y PMA)	77
12.5 ANEXO E: Preparación de reactivos	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de señalización inducidas por el TNF- α a través de sus dos receptores específicos TNFR1 y TNFR2.	16
Figura 2. Localización del TNF- α dentro del MHC en el brazo corto del cromosoma 6.	17
Figura 3. Organización del gen para TNF- α .	18
Figura 4. Elementos reguladores cis dentro de la región promotora del gen TNF- α humano.	19
Figura 5. Estrategia experimental.	28
Figura 6. RT-PCR. Expresión basal e inducida con PMA del RNAm de TNF- α en monocitos U-937 control y en co-cultivo con la línea SK-MES-1.	34
Figura 7. RT-PCR. Expresión basal e inducida con PMA del RNAm de TNF- α en monocitos U-937 control y en co-cultivo con la línea CALU-1.	36
Figura 8. RT-PCR. Expresión basal e inducida con PMA del RNAm de TNF- α en monocitos U-937 control y en co-cultivo con la línea SK-LU-1.	38
Figura 9. RT-PCR. Expresión basal e inducida con PMA del RNAm de TNF- α en monocitos U-937 control y en co-cultivo con la línea 3B1A.	39
Figura 10. Citometría de Flujo. TNF- α intracelular de U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral SK-MES-1.	42
Figura 11. Citometría de Flujo. TNF- α intracelular de U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral CALU-1.	43
Figura 12. Citometría de Flujo. TNF- α intracelular de U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral SK-LU-1.	44
Figura 13. Citometría de Flujo. TNF- α intracelular de U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral 3B1A.	45
Figura 14. Citometría de Flujo. TNF- α de membrana de U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral SK-MES-1.	47
Figura 15. Citometría de Flujo. TNF- α de membrana de U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral 3B1A.	48
Figura 16. Representación esquemática de los mecanismos de señalización intracelular que regulan la expresión génica y proteica de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α .	68
Figura 17. Modelo de un complejo intensificador (enhanceosoma) inducido por LPS.	71
Figura 18. Señalización intracelular activada por PMA en células U-937.	80

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Diferencia porcentual entre los IR´s de la población celular U-937 control y U-937 proveniente del co-cultivo con SK-MES-1.	35
Gráfica 2. Diferencia porcentual entre los IR´s de la población celular U-937 control y U-937 proveniente del co-cultivo con CALU-1.	37
Gráfica 3. Diferencia porcentual entre los IR´s de la población celular U-937 control y U-937 proveniente del co-cultivo con SK-LU-1.	38
Gráfica 4. Diferencia porcentual entre los IR´s de la población celular U-937 control y U-937 proveniente del co-cultivo con 3B1A.	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

1.1.1 GENERALIDADES

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, superado sólo por las enfermedades cardiovasculares¹, que se caracteriza por el crecimiento no controlado de un conjunto de células. En la actualidad se reconoce el cáncer como el resultado de anomalías genéticas en el ámbito celular que implica la mutación o el silenciamiento de un pequeño número de genes, muchos de los cuales actúan normalmente suprimiendo o favoreciendo la continuidad del ciclo celular, por lo que su alteración da lugar a una división celular descontrolada y a la formación de tumores^{2,5}.

Se ha propuesto un mecanismo de carcinogénesis que involucra tres etapas o fases: iniciación, promoción y progresión^{4,6}. La *iniciación* se lleva a cabo cuando la célula es afectada por algún agente genotóxico⁶ (químico, físico o biológico), ocasionando una mutación en los protooncogenes o genes supresores. Los protooncogenes son genes dominantes que codifican proteínas que participan como señales positivas en la proliferación celular^{4,6}; estas proteínas se agrupan en: *i*) factores de crecimiento, *ii*) receptores de factores de crecimiento, *iii*) transductores intracelulares, *iv*) factores de transcripción nuclear y *v*) proteínas de control del ciclo celular. Los oncogenes son producidos por mutaciones puntuales, translocaciones o sobre-expresión de los protooncogenes. Por otro lado, los genes supresores del tumor son genes recesivos que codifican proteínas involucradas en la señal negativa de la proliferación celular³⁻⁵. Una mutación en cualquiera de estos genes favorece la proliferación celular incontrolada asociada al cáncer.

La *promoción* consiste en el incremento de las mutaciones en una célula mediado por algún factor que favorezca la acción de los carcinógenos; cabe señalar que ni el agente promotor ni sus metabolitos producen mutaciones *per se*. Cuando el mismo carcinógeno u otro sigue en contacto con la célula iniciada puede producirse en ella un mayor número de mutaciones, originándose sitios frágiles o mutaciones, de forma tal, que la célula puede ganar autonomía al no depender de las señales del microambiente para proliferar. Cada nueva célula va presentando alteraciones en su material genético y esto contribuye a la heterogeneidad entre las células tumorales^{4,6}. La acumulación de las células transformadas forma un tumor primario *in situ*^{4,6}.

En la etapa de *progresión*, algunas de las células del tumor penetran los tejidos adyacentes, fenómeno conocido como *invasión*. Estas células transformadas alteran el patrón de expresión de las moléculas de adhesión, lo cual favorece su separación de las células vecinas, y migran hacia la membrana basal. Cuando esto ocurre y si las células neoplásicas son capaces de sintetizar enzimas proteolíticas, degradan la membrana basal, y pasan a la circulación a través de los vasos sanguíneos o vía linfática hasta ser fijadas en una red capilar.

Durante este proceso más del 99 % de las células mueren, las que sobreviven pasan a través de las células endoteliales, que revisten el interior de la pared capilar, y penetran en la matriz extracelular (ECM) adyacente para invadir hasta alcanzar una nueva localización y establecer un tumor secundario. El proceso anterior se denomina metástasis y es la principal característica de los tumores malignos^{6,7}.

El proceso de metástasis está estrictamente regulado por la expresión de genes que codifican enzimas denominadas metaloproteinasas, las cuales digieren la matriz extracelular. Se ha demostrado que existe una correlación directamente proporcional entre la producción de ciertas metaloproteinasas y la capacidad invasiva de las celulares tumorales. Las líneas tumorales con alta capacidad metastásica producen mayor cantidad de metaloproteinasas que las células tumorales con baja capacidad invasiva. Además, varios estudios han reportado que la actividad de estas metaloproteinasas se encuentra regulada por una proteína denominada inhibidor tisular de metaloproteinasa (TIMP). Dicha proteína TIMP es producida por células normales y suprime la actividad de las metaloproteinasas; en cambio, en las células tumorales este inhibidor (TIMP) no es producido o está reducido, por lo que se favorece la activación de las metaloproteinasas⁸ y en consecuencia se promueve la invasión.

1.1.2 FACTORES ASOCIADOS AL CÁNCER PULMONAR

En la actualidad, el cáncer pulmonar es considerado como el tumor maligno más frecuente en el mundo, causante de la mayor morbilidad y mortalidad. En México se considera que ocurren 18 muertes diarias debido a este padecimiento y se calcula que para el año 2010 su número se incrementará a 30 muertes diarias^{9,10}. En el cáncer pulmonar, los tipos histológicos de mayor frecuencia son el carcinoma epidermoide y el adenocarcinoma^{1, 8, 10}.

Asimismo, se ha descrito gran cantidad de factores ambientales o de exposición que favorecen el desarrollo del cáncer pulmonar. Como factores asociados al desarrollo de este tumor se encuentran los hábitos alimenticios. Los alimentos enlatados contienen conservadores que actúan como promotores; de igual modo, la ingesta excesiva de calorías se relaciona con una mayor tasa de proliferación celular que favorece la frecuencia de mutaciones. Contrariamente, la ingesta de ciertos antioxidantes, como algunas vitaminas, puede prevenir al cáncer por neutralizar los radicales libres; se ha observado que los individuos con alta ingesta de β -caroteno y vitamina C presentan un menor riesgo de desarrollar cáncer pulmonar^{5, 11, 12}.

El tabaquismo es el principal factor de riesgo asociado al desarrollo del cáncer de pulmón. El humo del cigarro es responsable del 85-90% de todos los casos diagnosticados como carcinoma pulmonar⁸. Las tres clases principales de carcinógenos contenidos en el humo del cigarro son: hidrocarburos policíclicos (benzo(a) pireno), nitrosaminas y aminas aromáticas¹³.

Los efectos carcinogénicos del humo del tabaco en el pulmón involucran la activación de otros carcinógenos e inactivación de enzimas de reparación, así como la formación de aductos en el DNA. Además, las partículas que se aspiran junto con el humo dañan al epitelio, que recubre los bronquios y los alvéolos, y en conjunto con los carcinógenos pueden producir mutaciones en estas células. Aproximadamente el 20% de los fumadores desarrolla algún tipo de carcinoma pulmonar; este porcentaje depende de diversos factores como el tipo de tabaco, el uso de filtros, la edad de inicio del tabaquismo, el índice tabáquico (número de cajetillas consumidas en un año), etc. También, se ha encontrado una correlación entre el desarrollo del cáncer pulmonar y los fumadores pasivos (personas expuestas al humo del cigarro)^{8,12}.

Reportes recientes han demostrado la asociación del hábito tabáquico con la inactivación de genes involucrados en el control del ciclo celular. La metilación aberrante en áreas ricas del dinucleótido citosina-guanina (islas CpG) localizadas dentro o cerca de las regiones promotoras de los genes, ha sido relacionada con la inactivación transcripcional de genes supresores de tumor¹⁴⁻¹⁶. Se ha encontrado alteraciones en los genes que codifican para algunos inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas como p16 (INK4a); lo anterior, permite la fosforilación constitutiva de la proteína retinoblastoma (Rb) e inactivación de sus propiedades supresoras del crecimiento¹⁶.

Varios reportes indican que la metilación aberrante puede presentarse durante el proceso pre-neoplásico y es un potente biomarcador para el diagnóstico temprano del cáncer pulmonar así como para su seguimiento. Además, *in vitro*, la metilación aberrante puede ser revertida por fármacos como la 5-aza-2-deoxicitidina, lo que induce la re-expresión del gen y la inhibición del crecimiento tumoral¹⁷.

Por otro lado, existe una fuerte relación entre el cáncer pulmonar y la actividad de la telomerasa^{19,20}. En la región terminal de los cromosomas (telómero) existen dos tipos de secuencias teloméricas. El primer tipo, denominado secuencias de DNA telomérico, consiste en cortas repeticiones en tándem que contribuyen a la estabilidad e integridad de los cromosomas. En el humano las secuencias del DNA telomérico se han mantenido conservadas a lo largo de la evolución, lo cual refleja la función esencial que desempeñan en el mantenimiento de la integridad de los cromosomas. En relación con el segundo tipo, las secuencias son repetitivas y se encuentran tanto adyacentes al telómero como dentro del mismo, por lo que se han denominado secuencias asociadas al telómero, actualmente se desconoce su función.

Para que se lleve a cabo la replicación de los telómeros se requiere de una enzima denominada telomerasa que contiene RNA y añade secuencias cortas de DNA repetidas en tándem a los extremos de los cromosomas eucarióticos.

Sin ella, el DNA de los extremos de los telómeros se va acortando en cada ciclo celular de las células somáticas, este acortamiento de los cromosomas es parte del proceso natural del envejecimiento y de la muerte celular¹⁸. Por el contrario, las células germinales, algunas células pluripotenciales y las células cancerosas mantienen la actividad de la telomerasa, permitiendo potenciar la inmortalidad celular¹⁸. La mayoría de los cánceres de pulmón muestran altos niveles de la actividad telomerasa asociada con los incrementos en la velocidad de la proliferación celular^{19,20}.

En otro aspecto, el cáncer pulmonar también se ha asociado con la presencia de radón y asbesto. El radón es un gas que se produce por el decaimiento radiactivo del uranio. Se ha observado gran incidencia del cáncer pulmonar en trabajadores de minas de uranio y en personas que viven cerca de éstas. El radón emite partículas alfa que, al ser aspiradas, llegan a los conductos bronquiales dañando la integridad celular y aumentando la posibilidad de la aparición de mutaciones^{5, 12, 21}.

Con respecto al asbesto, éste está constituido principalmente por silicatos y se emplea en la construcción de viviendas y elaboración de materiales adiabáticos. Las fibras de asbesto que ingresan a las vías respiratorias pueden ser fagocitadas por los macrófagos alveolares; pero al no ser degradadas se origina su acumulación, causando el proceso patológico conocido como asbestosis. La exposición prolongada a concentraciones altas de asbesto se asocia con el desarrollo del cáncer pulmonar^{4,21}.

1.1.3 TIPOS HISTOLÓGICOS DEL CÁNCER PULMONAR

La clasificación de los tumores pulmonares se basa principalmente en la microscopía de luz; aunque recientemente se ha apoyado en otras técnicas como la inmunohistoquímica y la microscopía electrónica. Se ha propuesto diversos esquemas de clasificación, siendo el más aceptado el presentado por la *Organización Mundial de la Salud* del 2004²², la cual clasifica a los tumores pulmonares primarios en: (1) adenocarcinoma, (2) carcinoma epidermoide, (3) carcinoma de células grandes y (4) carcinoma de células pequeñas. Los dos primeros tipos histológicos presentan distintos grados de diferenciación. Con respecto a su comportamiento clínico, los tres primeros tipos se agrupan como carcinoma de células no pequeñas (NSCLC), y al cuarto tipo como carcinoma de células pequeñas (SCLC)²¹.

1.2 SISTEMA INMUNE Y CÁNCER

1.2.1 GENERALIDADES

El sistema inmune está involucrado en la detección y eliminación de patógenos que pudieran ocasionar daño al organismo. En cuanto al cáncer, se ha demostrado que la respuesta inmune participa en el reconocimiento²³, el control del desarrollo y la eliminación del tumor²⁴.

Evidencia experimental indica que ambos tipos de respuesta inmune: innata y adaptativa, juegan un papel importante en los procesos anti-tumorales presentados por el huésped. La observación microscópica de los tumores ha permitido identificar a las células del sistema inmunitario infiltrantes del tumor como: polimorfonucleares, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales (células NK), linfocitos T y B, principalmente.

Para explicar cómo responde el sistema inmune frente a las células tumorales se ha propuesto dos modelos teóricos complementarios: (1) el concepto de *vigilancia inmunológica*²⁵, el cual propone que las células tumorales expresan antígenos asociados al tumor (TAAs o tumor-associated antigens), que al ser reconocidos como no propios por las células NK y las células T, primordialmente, generan la activación de estas células inmunes así como el ensamble de los mecanismos citotóxicos asociados a la eliminación del tumor, para evitar su desarrollo y progresión. Y (2) el *modelo de peligro*²⁶, éste postula que el sistema inmune está involucrado en detectar “peligro” a través de las células presentadoras de antígeno profesionales (APC, antigen-presenting cells) como: macrófagos y células dendríticas, quienes al ser activadas por estas señales montan una respuesta citotóxica anti-tumoral además de la estimulación de la respuesta inmune de tipo específica mediada por las células T.

1.2.2 INMUNOBIOLOGÍA DEL TUMOR

Se considera que durante el proceso de carcinogénesis, una célula transformada va acumulando mutaciones y perdiendo gradualmente su estabilidad genómica. Al menos tres clases de defectos genéticos pueden originar la inestabilidad genómica: (1) defectos en la reparación y replicación del DNA, (2) segregación anormal de cromosomas y (3) defectos en el control del ciclo celular. Dicha inestabilidad origina alteraciones características en las células cancerosas como: la proliferación incontrolada y la capacidad para extenderse o producir metástasis.

La inestabilidad genómica es un sello molecular de la carcinogénesis, presenta al menos dos implicaciones en relación directa con el sistema inmune innato como primer mecanismo de defensa anti-tumoral.

I. Las alteraciones genéticas y epigenéticas de las células cancerosas permite la constante generación de nuevos antígenos. Además, es probable que ciertos genes que se encontraban inactivos en el tejido de origen normal, o expresados relativamente en bajos niveles, sean activados radicalmente en el cáncer. Aunque estos cambios genéticos y epigenéticos no necesariamente crean neo-antígenos específicos del tumor, sí incrementan la concentración de proteínas codificadas en varios órdenes de magnitud, afectando drásticamente la antigenicidad; por tanto, las células cancerosas presentan un perfil antigénico diferente al de las células normales, quienes mantienen su perfil antigénico estable. Bajo el contexto del modelo de “vigilancia inmunológica”, las células NK pueden detectar, en las células transformadas, las alteraciones de la expresión normal de antígenos propios, induciendo su actividad citotóxica.

II. La inestabilidad genómica también afecta la homeostasis celular y tisular; esto genera fuertes señales proinflamatorias, generalmente en forma de citocinas y quimiocinas, las cuales son las principales iniciadoras de la respuesta inmune: innata y adaptativa. En el contexto del modelo de “peligro” estas señales inflamatorias activan mecanismos celulares citotóxicos inespecíficos y células presentadoras de antígeno (APC), particularmente macrófagos y células dendríticas.

1.2.3 RESPUESTA INMUNE INNATA FRENTE A LAS CÉLULAS TUMORALES

Las células del sistema inmune innato (células NK, macrófagos, células dendríticas) tienen la función de inspeccionar e informar al huésped el rompimiento de la integridad en la homeostasis celular y tisular, también poseen funciones efectoras intrínsecas anti-tumor incluyendo: lisis de las células tumorales o bloqueo de la diseminación tumoral. Asimismo son las encargadas de activar una respuesta inmune adaptativa anti-tumoral mediada por células T.

Células asesinas naturales (NK)

Las células NK son células linfoides con gránulos intracelulares prominentes. Inicialmente, las células NK fueron definidas por su capacidad de eliminar ciertas células transformadas sin previa sensibilización, de ahí su nombre *asesinas naturales*. Las células NK están presentes en sangre periférica de individuos sanos y de pacientes con cáncer. Tras reconocer a las células tumorales, ejercen su actividad citotóxica vía perforinas/granzimas así como FAS/FASL, ambas vías conducen a la muerte celular programada o apoptosis. La actividad citotóxica de las células NK puede ser incrementada por la presencia de citocinas como la interleucina-2 (IL-2) y el interferón gamma (IFN- γ). La activación de las células NK induce la producción y liberación de citocinas (IFN- γ , factor de necrosis tumoral alfa o TNF- α , factor estimulante de colonias, GM-CSF) y quimiocinas o factores quimiotácticos (proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α , MIP-1 β y RANTES). En conjunto, estas moléculas promueven el reclutamiento y la activación de las células inmunes con capacidad citotóxica inespecífica como: macrófagos, neutrófilos, y más células NK.

El reconocimiento de las células tumorales por parte de las células NK y su posterior activación citotóxica están mediados por un balance de señales transmitidas vía receptores: estimulatorias e inhibitorias. No obstante, existe cierta controversia acerca del mecanismo por el cual las células NK distinguen a las células normales de las tumorales. Una hipótesis que explica uno de estos posibles mecanismos de discriminación es el “reconocimiento de lo propio alterado” (missing self recognition); esta hipótesis postula que las células NK eliminan a las células que han perdido o alterado su patrón normal de expresión de las moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad (major histocompatibility complex o MHC)²⁷ (ver recuadro 1).

La identificación de los receptores inhibitorios de la activación sobre la superficie de las células NK, específicos para moléculas clase I, ha apoyado esta hipótesis, ya que los receptores inhibitorios aseguran que las células NK no ejerzan sus funciones efectoras en contra de las células que expresan niveles normales de las moléculas del MHC clase I, manteniendo así la tolerancia a lo propio²⁷.

Se ha propuesto que la célula NK se une a la célula diana y subsecuentemente se inicia la función efectora que requiere de receptores de activación. La identificación de dichos receptores sustentan la noción de que las células NK median su función efectora a través de estas señales vía receptores de superficie celular tanto estimulatorios como inhibitorios. La citotoxicidad mediada por células NK requiere de la adhesión a la célula diana y la formación de la llamada “sinapsis inmunológica” entre ambas células; proporcionando un ambiente cercado para la liberación de los gránulos citotóxicos. Una sinapsis inmunológica es formada cuando la célula NK reconoce a la célula diana e induce la acumulación de proteínas, seguida de la segregación de éstas dentro del dominio de la sinapsis²⁷.

Recuadro 1. Brevemente, el complejo principal de histocompatibilidad o MHC es un grupo de genes que codifican a moléculas que proporcionan el contexto del reconocimiento de antígenos propios de los no propios. El complejo está dividido en tres regiones, clase II (genes HLA-DR, -DP y -DQ), clase III (incluye genes que codifican moléculas del complemento y al factor de necrosis tumoral o TNF) y clase I (genes HLA-A, -B, -C, -E, -H, -G y -F, siendo los tres primeros alelos denominados moléculas clásicas y los restantes, moléculas no clásicas). La expresión de moléculas de MHC es diferenciada. En general se considera que las moléculas del MHC de clase II se asocian a péptidos antigénicos extracelulares, ya sea de patógenos o bien de células tumorales. En cambio, las moléculas de MHC de clase I se asocian a péptidos antigénicos intracelulares propios o de patógenos intracelulares. La captura y presentación de antígenos al sistema inmune es un proceso complejo que involucra un número de chaperonas intracelulares que se encuentran codificadas en la región clase III.

Si el balance de señales estimuladoras e inhibitorias favorece a la inhibición, la sinapsis probablemente se revierte en esta etapa; de forma contraria, si el balance de señales se posicionan favoreciendo a la activación, ocurre la formación de una sinapsis estable. Se ha observado en esta sinapsis, (1) la formación de un anillo alrededor de los receptores de señalización constituido por la participación de proteínas de adhesión celular, pertenecientes a la familia de las integrinas como: LFA-1 (antígeno-1 asociado a la función leucocitaria), junto con la actina y la talina, (2) la acumulación de gránulos citolíticos, (3) la relocalización de la organización central de microtúbulos hacia el centro de la sinapsis inmunológica de la célula NK y (4) el reclutamiento de moléculas que median la señalización de las funciones efectoras, como la exocitosis de los gránulos²⁷.

El receptor estimulador NKG2D es el mejor caracterizado, expresado sobre células NK, juega un papel clave en la inmunovigilancia tumoral^{27,28}. En contraste con otros receptores estimuladores, NKG2D es expresado sobre todas las células NK.

El receptor NKG2D tiene dos aminoácidos cargados en su dominio transmembranal que permite la asociación con moléculas adaptadores de señalización: DAP10 o DAP12. Estos adaptadores son selectivamente expresados en diferentes tipos de células y median estimulación por vías separadas^{27,28}. En 1999, Bauer y colaboradores²⁸, identificaron proteínas como ligandos para el receptor NKG2D humano, codificadas mediante un gen inducible por estrés relacionado con el MHC de clase I: MICA y MICB (MHC class I chain-related gene). Ellas son capaces de activar la citotoxicidad de las células NK. A diferencia de las moléculas del MHC clase I, MICA y MICB se encuentran establemente expresadas sin la presentación del péptido, no se asocian con β_2 -microglobulina, carecen de los sitios de unión para CD8 y no son inducidas por IFN- γ . Los genes para MICA y MICB están regulados por elementos promotores de choque térmico. Es conocido que los promotores de choque térmico son activados en general en respuesta al estrés celular; por tanto MICA y MICB han sido considerados como genes de respuesta al estrés celular. Un análisis correlativo en cánceres humanos, sugiere una relación entre la expresión de MICA/B y la infiltración de células que expresan el receptor NKG2D²⁸.

Células presentadoras de antígeno profesionales: Macrófagos

En respuesta a las señales inflamatorias, consecuencia del estrés genotóxico inducido por la transformación y el trastorno del microambiente circundante, los macrófagos son reclutados al sitio del tumor por la expresión de moléculas de adhesión sobre las células endoteliales y por la presencia de proteínas quimiotácticas y citocinas liberadas.

Los macrófagos son células extremadamente versátiles involucradas en un número de funciones complejas en salud y en enfermedad. La relevancia de los macrófagos en cáncer se encuentra soportada por reportes, los cuales documentan, que la mayoría de las células infiltrantes al tumor son macrófagos^{29,88,100,101}. La activación del macrófago -definida como la adquisición de competencia a ejecutar una función compleja-, produce la adquisición de funciones efectoras citocidas y la secreción de citocinas pro-inflamatorias; resultando en inflamación y reclutamiento de células inmunes, y la subsiguiente eliminación o delimitación del crecimiento tumoral. Esta activación del macrófago puede ser inducida por una amplia gama de agentes, los más importantes en el contexto de la respuesta inmunológica son las citocinas liberadas por las células NK (IFN- γ , TNF- α) y las células T cooperadora (T_H), como el IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-4, entre otros. Los macrófagos activados median la respuesta inmune anti-tumor a través de varios mecanismos: 1) el procesamiento y la presentación de antígenos del tumor, 2) la estimulación de linfocitos T cooperadores o de ayuda y de los linfocitos T citotóxicos, y 3) la liberación de moléculas efectoras con actividad citostática y/o citotóxica.

1) Procesamiento y presentación de antígeno.

Se ha descrito dos vías de procesamiento de antígenos. Las proteínas o péptidos antigénicos endógenos y exógenos son procesados en diferentes compartimentos celulares. Los fragmentos peptídicos ya procesados se asocian a glucoproteínas de membrana codificadas por el MHC. Estas moléculas de superficie del MHC poseen una hendidura de unión al péptido y pueden acoplar una amplia variedad de fragmentos peptídicos. Las distintas moléculas del MHC clase I y clase II, conducen péptidos intracelulares hasta la superficie de la célula para conformar el perfil antigénico celular.

Los monocitos/macrófagos internalizan cuerpos apoptóticos, antígenos liberados y/o secretados por las células tumorales, los cuales son procesados por una vía endocítica. Los antígenos tumorales interiorizados penetran a la célula por endocitosis quedando envueltos en vesículas conocidas como endosomas, que se acidifican de forma progresiva a medida que avanzan hacia el interior de la célula. Las vesículas o endosomas contienen proteasas ácidas (cisteinproteasas catepsinas B, D, S y L) que se activan a pH ácido y degradan a las proteínas contenidas. Los péptidos generados se unen a moléculas del MHC clase II. Las cuales consisten en un complejo no covalente formado por dos cadenas α y β , ambas transmembranales. Como toda glicoproteína de superficie, su ruta biosintética comienza con su translocación al retículo endoplásmico (RE), aquí las moléculas de MHC de clase II recién sintetizadas se ensamblan con una proteína conocida como cadena invariante (Ii).

La cadena Ii desempeña una función dual: por un lado (1) bloquea y evita la unión de péptidos o proteínas parcialmente plegadas presentes en el lumen del RE; ya que la cadena Ii se une dentro del surco de unión al péptido formado por el heterodímero $\alpha:\beta$ del MHC clase II y de esta manera los péptidos del RE no suelen ser presentados por moléculas de MHC clase II. Por otro lado (2) dirige la entrega de moléculas del MHC clase II desde el RE al compartimiento endosomal de pH ácido, donde los péptidos procesados se unen al complejo $\alpha:\beta$ para ser presentados en la superficie celular. En general se considera que los péptidos tumorales se asocian a moléculas de MHC clase II, y son reconocidos por células T cooperadoras (CD4⁺).

Por otra parte, las moléculas de clase I unen péptidos de proteínas degradadas en el citoplasma de la célula. Las proteínas celulares son degradadas continuamente y reemplazadas por otras recién sintetizadas, una parte considerable de la degradación de proteínas en el citosol es realizada por un gran complejo multicatalítico denominado *proteasoma*. Las proteínas destinadas a degradarse se introducen en el núcleo del proteasoma y ahí se procesan en fragmentos peptídicos pequeños. Los péptidos generados por el proteasoma son translocados al lumen del RE por proteínas transportadoras de antígeno 1-2 (TAP1, 2) dependientes de ATP. Donde se unen a moléculas de MHC clase I recién sintetizadas que permanecen en el RE. Las moléculas de MHC clase I consisten en dos cadenas polipeptídicas: la cadena α , codificada por el MHC, y otra cadena más pequeña asociada a ésta de forma no covalente, la β_2 -microglobulina, que no es codificada por el MHC. Sólo la cadena α es transmembranal. En los seres humanos la cadena α de MHC de clase I recién sintetizada se une a una molécula chaperona llamada calnexina, que retiene a las moléculas de clase I en un estado de plegamiento parcial en el RE. Cuando la β_2 -microglobulina se une a la cadena α , el heterodímero parcialmente plegado se disocia de la calnexina y se une a un complejo de proteínas especializadas que permiten su plegamiento total. Una vez que el heterodímero $\alpha:\beta_2$ microglobulina se une al péptido procesado se estabiliza este complejo y es liberado del RE para ser expresado sobre la superficie celular. De esta manera, se conforma un perfil antigénico en la superficie de la célula normal, a través de las moléculas de MHC clase I. Así, cuando se sufre un proceso de transformación tumoral, este perfil antigénico es alterado, presentado nuevos péptidos asociados al tumor unidos a moléculas del MHC clase I. El complejo péptido tumoral/molécula del MHC de clase I, puede ser reconocido por el receptor de células T citotóxicas (TCR).

Como se mencionó anteriormente, bajo el contexto del cáncer, las células tumorales que presentan alteraciones genéticas y epigenéticas inducen o incrementan la expresión de proteínas celulares, produciendo alteraciones en el patrón antigénico normal. La presentación de estas proteínas intracelulares asociadas al tumor, a través de moléculas MHC clase I, pueden ser reconocidas por los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) o células NK, induciendo la muerte de la célula tumoral.

2) Estimulación de linfocitos T

Sólo las células presentadoras de antígeno profesionales (APC, antigen-presenting cells) son capaces de activar a las células T específicas del tumor y así iniciar una respuesta inmune adaptativa. De hecho, son consideradas como el puente entre la respuesta inmune innata y la adaptativa.

Los linfocitos o células T “naïve” una vez que han completado su desarrollo en el timo, entran al torrente sanguíneo, dirigiéndose hacia los órganos linfoides periféricos hasta que encuentran a su antígeno específico. La activación de las células T naïve requiere de la coligación del receptor específico de antígeno y uno de los correceptores CD4 o CD8 con el complejo fragmento peptídico extraño/molécula de MHC propio, además de la liberación simultánea de una señal coestimuladora por parte de la células APC. Únicamente las células APC expresan ambas clases de moléculas MHC y las moléculas de superficie coestimuladoras (moléculas B7.1 y B7.2), que inducen la expansión clonal de la célula T naïve y su diferenciación en células T efectoras. Las células T efectoras se dividen en tres clases funcionales, que detectan antígenos peptídicos derivados de distintas fuentes.

Como vimos anteriormente, los péptidos provenientes de antígenos intracelulares asociados al tumor son unidos a moléculas de MHC clase I y presentados a las células T citotóxicas (CD8⁺); estas últimas se encargan de eliminar a las células tumorales. Y los péptidos provenientes de antígenos extracelulares derivados del tumor se asocian a moléculas de MHC de clase II, reconocidas por células T cooperadoras (CD4⁺) que pueden diferenciarse en dos tipos de células efectoras (T_H1 o T_H2). Las células T_H1 actúan sintetizando proteínas asociadas a membrana (ligando CD40, ligando Fas, receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5) y citocinas solubles (IFN- γ , receptor de IL-12, IL-2, GM-CSF y TNF- α) las cuales coordinan la respuesta inmunitaria celular, favoreciendo la activación de las células T citotóxicas y de los macrófagos, siendo ésta la función principal de las células T_H1. En cambio, las células T_H2 a través de la liberación de citocinas como: IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 y TGF- β , inician la respuesta inmunitaria humoral. De forma simultánea, las células T_H1 y T_H2 activan a las células B para producir diferentes tipos de anticuerpos dirigidos en contra del tumor. No obstante, la respuesta inmune mediada por células (linfocitos T citotóxicos, NK y macrófagos) es la que tiene un papel preponderante en la erradicación del tumor.

3) Liberación de moléculas efectoras con actividad citostática y/o citotóxicas.

La activación de los macrófagos por factores solubles como el IFN- γ liberado por células T_H1, o por la interacción celular (macrófago-célula T_H1) a través de la coligación del ligando CD40 presente en las células T_H1, con la molécula CD40 expresada en los macrófagos, promueve la expresión y liberación de moléculas con función citotóxica tales como: especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, óxido nítrico (NO) y TNF- α .

El IFN- γ activa al sistema enzimático que cataliza los cambios oxidativos conocido como el sistema de la NADPH oxidasa, que consiste por lo menos de 4 subunidades: las glicoproteínas gp 91 phox y p22 phox (las dos subunidades del citocromo b558 membranar, el cual es el acarreador electrónico terminal de la oxidasa) y las glicoproteínas p47 phox y p67 phox, ambos componentes citoplasmáticos del sistema; este sistema enzimático produce las especies intermediarias reactivas del oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales de hidroxilo, y oxígeno singlete). El NO se produce por la enzima NO sintetasa inducible (iNOS) dependiente de NADPH, a partir de L-arginina.

Las especies generadas tienen las ventajas de ser moléculas de bajo peso molecular, altamente reactivas y lipofílicas, lo cual les permite penetrar a las células con facilidad, causando daño tisular y celular. La producción de la lisis celular es originada por: (1) las lesiones de las membranas citoplásmicas y de los organelos, (2) la inactivación de enzimas, (3) oxidación de lípidos y (4) daño al DNA.

Asimismo, el TNF- α es el principal producto liberado por los macrófagos activados y es el principal factor citotóxico en contra de las células tumorales sin afectar a las células normales, además de ser capaz de inducir apoptosis en la célula tumoral. También el TNF- α favorece la producción y liberación de citocinas pro-inflamatorias como: IL-1, IL-6 y más TNF- α . Además la liberación de IL-12 que dirige la diferenciación de células T cooperadoras naïve (T_H0) a células efectoras T_H1 , reforzando la respuesta inmune celular en contra del tumor.

1.3 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA

El TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) presenta una historia dual. Por un lado, fue descubierto a través de investigaciones en la patogénesis del marasmo (caquexia) en enfermedades crónicas (Cerami, A. y colaboradores, 1975)³²⁻³⁴; y a la vez, fue descubierto en un intento por entender la necrosis hemorrágica presentada por los tumores bajo contextos de infecciones bacterianas agudas (Carswell, E. A. y colaboradores, 1975)³⁰. Estos últimos describieron la presencia del TNF en el suero de ratones tratados con la endotoxina bacteriana (en ratones previamente sensibilizados con el *Bacillus* de Calmette-Guerin). El análisis de la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas demostró que el TNF- α como la caquectina son la misma molécula³⁵. Por tanto, el TNF es referido como TNF- α , caquectina o factor inductor de la diferenciación (DIF, differentiation-inducing factor). El TNF- α pertenece a una familia que comprende cerca de 20 diferentes proteínas homólogas que incluyen TNF β /linfotoxina α , linfotoxina β , ligando CD40 y ligando de Fas, entre otras³¹.

1.3.1 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL TNF

El TNF- α originalmente caracterizado como un factor citotóxico para muchas células malignas, es considerado como una citocina pleiotrópica, es decir, que ejerce diversas actividades biológicas benéficas o adversas dependiendo del tipo celular, dosis y frecuencia del estímulo^{29-34,115,117}. El TNF- α presenta un amplio espectro de acción biológica, desde respuestas proliferativas como son: crecimiento y diferenciación celular, así como efectos inflamatorios y regulación de la respuesta inmune, hasta la destrucción celular a través de mecanismos de muerte como son: apoptosis y necrosis. Siendo su papel principal la regulación de las células inmunes^{31,34}.

No obstante, está altamente involucrado en desordenes patogénicos como: artritis reumatoide, asma, choque séptico, fiebre hemorrágica y caquexia³³⁻³⁴. En este sentido, se ha observado que sus efectos patológicos son dosis-dependientes (ver tabla 1). La exposición aguda a altas dosis de TNF produce el síndrome del choque séptico así como daño tisular, a pesar de su corta vida media en circulación (6-20 min). Por otro lado, la exposición crónica de TNF causa caquexia y tolerancia, caracterizada por anorexia, pérdida de peso, deshidratación y disminución de proteínas y lípidos³¹⁻³⁴.

Tabla 1. Efectos sistémicos del TNF

Agudo, altas dosis	Crónico, bajas dosis
Choque séptico y daño tisular	Pérdida de peso
Liberación de hormonas catabólicas	Anorexia
Necrosis gastrointestinal	Hepato-esplenomegalia
Necrosis tubular renal aguda	Inflamación subendocardial
Reducción del potencial de membrana en músculo	Resistencia a insulina
Hemorragia adrenal	Incrementa la velocidad de metástasis de tumores
Disminución de la coagulación intravascular	Liberación de proteínas de fase aguda
Fiebre	Activación endotelial.

Los macrófagos o monocitos activados son las principales células productoras del TNF- α ; sin embargo, una extensa variedad de tipos celulares sintetizan esta molécula entre las que se incluyen: células T y B, células cebadas, células NK, queratocitos, células dendríticas, fibroblastos, leucocitos polimorfonucleares, astrocitos, adipocitos, así como algunas células tumorales³¹.

Entre los inductores del TNF- α se encuentran: el mismo TNF- α , el lipopolisacárido (LPS)^{30,35}, algunos ésteres de forbol (principalmente forbol miristato acetato, PMA³⁶, y tetra-decanoil-forbol-13), ionóforos de calcio³⁷, taxol³⁸, virus sendai³⁹, virus herpes simplex-1⁴⁰, *Candida albicans*⁴¹, complejos inmunes, C5a, citocinas como el IFN- γ ³¹, entre otros.

El TNF es un importante mediador de la inflamación que activa a leucocitos, incrementa la adherencia de neutrófilos y monocitos al endotelio, promueve migración de células inflamatorias dentro de la matriz extracelular, estimula proliferación de fibroblastos y dispara la producción local de otras citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-1)^{31,33,42}. Estos y otros numerosos efectos proinflamatorios han sido implicados en aspectos benéficos del TNF tendientes a contribuir en: (a) la localización y eliminación de la infección, (b) incrementar la citotoxicidad en contra de células malignas, (c) facilitar la remodelación de tejido. Sin embargo, la excesiva producción de TNF está involucrada directamente en la patofisiología de diversas enfermedades, antes mencionadas^{34,42}.

1.3.2 MOLÉCULA DE TNF- α

La secuencia de cDNA que codifica al TNF- α humano, presenta un fragmento de lectura abierta que codifica una proteína precursora de 233 aminoácidos^{43-47,63}. Esta proteína precursora denominada pro-proteína de 26 kDa (TNF- α intracelular) contiene regiones hidrofílicas e hidrofóbicas que permiten su anclaje a la membrana celular (TNF- α de membrana). El TNF- α unido a membrana puede ser escindido en el enlace peptídico Ala76-Val77 por la enzima desintegrina metaloproteinasas, también llamada TNF- α convertasa (TACE)^{48,49}, siendo liberado a los fluidos biológicos como una proteína madura soluble de 17 kDa con 157 aminoácidos. Tanto la forma soluble como la embebida en la membrana son activas. Se ha observado que el TNF- α en condiciones fisiológicas se encuentra formando un complejo homotrimérico ensamblado no-covalentemente. La estructura tridimensional de la molécula revela una forma de cono triangular o campana invertida, lo cual genera una mayor superficie de contacto que puede causar un incremento exponencial en la avidéz del ligando por su receptor⁶³. El trímero de TNF- α soluble, como el membranal poseen la habilidad de unirse a 2 tipos de receptores específicos con alta afinidad^{50,51,63}.

1.3.3 RECEPTORES DE TNF- α

Tanto la molécula transmembranal como la proteína soluble de TNF- α ejercen sus diversos efectos biológicos al asociarse a dos tipos de receptores específicos de distintas masas moleculares: (i) Receptor TNF- α tipo I o p55/60 (TNFR1/CD120a) y (ii) Receptor TNF- α tipo II o p75/80 (TNFR2/CD120b)⁵³. Estos receptores se encuentran expresados en muchos tipos celulares. De manera diferencial, el TNFR1 se expresa constitutivamente en todas las células nucleadas; mientras el TNFR2 está restringido principalmente a células del linaje hematopoyético. Se ha demostrado que el número de receptores varía entre 200 y 10,000 dependiendo del tipo celular, y su constante de unión es aproximadamente 2×10^{-10} M^{42,51,63}. Aunque la presencia del receptor TNF- α es un prerrequisito para su efecto biológico, no existe correlación entre el número de receptores y la magnitud de la respuesta.

La clonación molecular de los receptores de TNF y sus ligandos permitieron el reconocimiento de la superfamilia de receptores de TNF/NGF, la cual comprende al menos 10 miembros diferentes (receptor NGF p75, TNFR1 p55, TNFR2 p75, receptor TNF-RP, CD27, CD30, CD40, CD95, 4-1BB y OX40). Los miembros de la superfamilia son glicoproteínas de membrana tipo I, caracterizados por presentar en la región extracelular secuencias repetidas ricas en residuos de cisteína, involucradas en la unión con su ligando. Paralelamente existe la superfamilia de los ligandos TNF (TNF, LT- α , LT- β , CD27L, CD30L, CD40L, CD95L, 4-1BBL y OX40L), estas moléculas son glicoproteínas de membrana tipo II^{51,52}.

La unión del ligando TNF- α con su receptor induce reclutamiento y multimerización de receptores, lo cual favorece la activación de diversas vías de señalización. Los TNFR1 y TNFR2 poseen dominios citoplasmáticos “modestos” en longitud y funcionan como sitios de acoplamiento para la señalización intracelular. La señalización de moléculas ocurre a través de dos principales clases de proteínas: (1) adaptadoras citoplasmáticas TRAF (TNF receptor-associated factor) y (2) moléculas con dominio de muerte DD, TRADD (TNF receptor-associated death domain protein); la señalización es extremadamente rápida y específica⁵⁵.

El TNFR1 es el receptor más estudiado, tiene la propiedad de ser escindido de la membrana; la forma soluble es encontrada en el suero de pacientes con leucemia; además la estimulación del TNFR1 permite la internalización del receptor. Ambos procesos permiten una inhibición de las acciones biológicas del receptor a largo plazo⁵².

Varios autores coinciden en que la vía de señalización que conduce a la muerte celular por apoptosis se encuentra preferentemente asociada al receptor TNFR1, el cual contiene en su región citoplasmática secuencias denominadas “dominios de muerte” (DD), responsables de la inducción de la apoptosis^{52, 53,54}.

Por otra parte, el TNFR2 fue clonado completamente después del TNFR1 y su caracterización estructural y funcional es menos entendida. El TNFR2 es igualmente activado por ambas formas del ligando: soluble o de membrana. No obstante, ensayos experimentales han demostrado que la forma membranal del TNF de 26 kDa es mejor activador del TNFR2 a diferencia del TNF soluble de 17 kDa, permitiendo nuevas señales dentro de la función del TNFR2⁵³.

Una vez activado el TNFR2 es rápidamente escindido por metaloproteinasas, esta forma soluble o liberada del receptor es capaz todavía de unirse al ligando de TNF. El papel funcional del TNFR2 en la respuesta celular no está completamente entendido, mas la activación del TNFR2 en algunas células como linfocitos T y timocitos, principalmente, ha sido de proliferación, pero se conoce que el TNFR2 tiene una función sobre la regulación de la apoptosis inducida por el TNF⁵³.

El TNFR2 no contiene una secuencia DD, mas puede reclutar proteínas adaptadoras capaces de señalar hacia la apoptosis. También se ha propuesto un mecanismo llamado “ligand-passing”, por el cual el TNFR2, con afinidad y vida media de unión al TNF alta, sujeta al ligando TNF e incrementa la concentración local del ligado en la vecindad del receptor TNFR1, éste acepta al ligando a partir del TNFR2 e inicia la señalización que conduce a la apoptosis⁵³ (ver Figura 1).

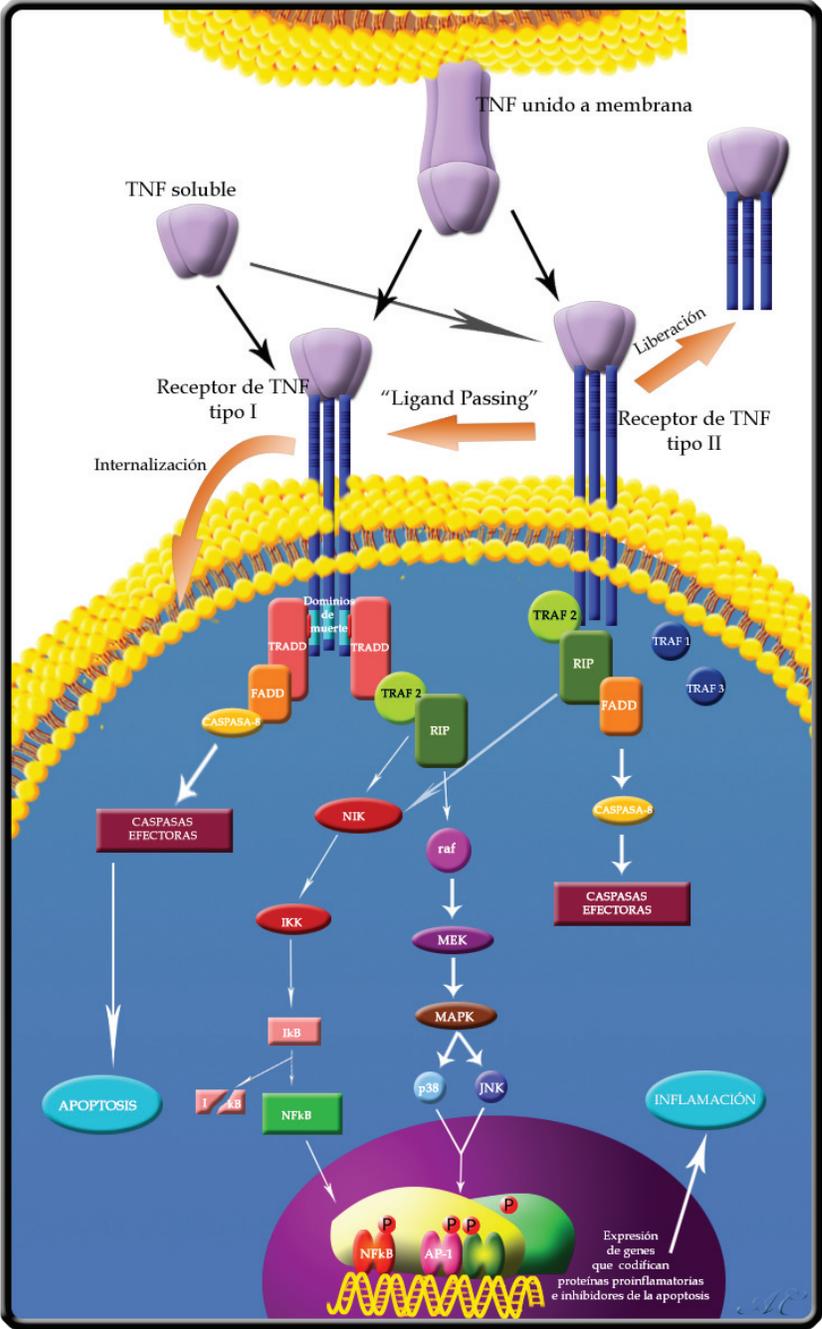


Figura 1. Vías de señalización inducidas por el TNF-α a través de sus dos receptores específicos TNFR1 y TNFR2. *Cellular Signalling* 14 (2002) 477-492.

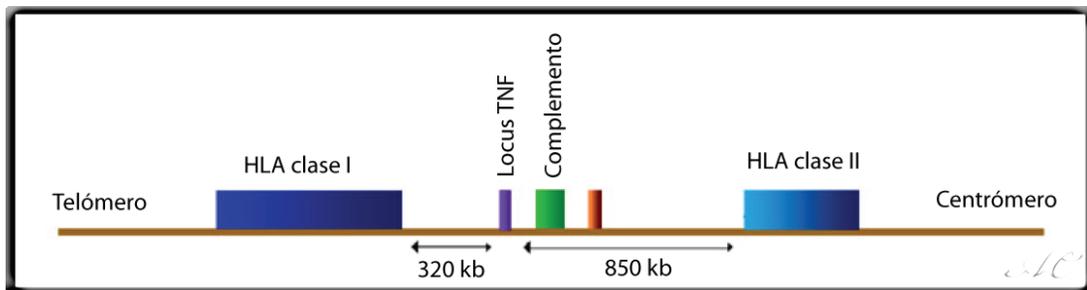
1.3.4 SEÑALIZACIÓN DEL TNF- α A TRAVÉS DE SUS RECEPTORES

La señalización del TNF- α es muy compleja. Brevemente, la unión del trímero de TNF- α al receptor TNFR1 induce su trimerización y el reclutamiento de algunas proteínas de señalización intracelular con unión a los dominios DD del receptor. La primera proteína reclutada al TNFR1 es TRADD, la cual sirve como plataforma para reclutar a tres mediadores adicionales más pequeños: RIP-1 (receptor-interacting protein-1), FADD (Fas-associated death domain protein) y TRAF2, este último posee alta afinidad por TRADD y tiene la capacidad de interactuar directamente con el TNFR2. FADD contiene un dominio efector de muerte (DED), el cual interacciona con el dominio DED de la caspasa 8 y forma el complejo de señalización de inducción de muerte del TNFR1 o DISC (Death-inducing signalling complex). Este complejo activa a una serie de moléculas diana: caspasas⁵⁶, lipasas⁵³⁻⁵⁵ y proteínas cinasas^{53,57}, quienes propagan la señalización intracelular^{52-55,57,58} (ver Figura 1). Para mayor comprensión de las moléculas involucradas en las vías de señalización intracelular, así como de las mismas vías, revisar el anexo A.

1.3.5 ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL TNF- α

En la especie humana, el gen que codifica para la molécula de TNF- α está localizado dentro del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en el brazo corto (p) del cromosoma 6, entre las bandas p21.1 y p21.3. De manera particular, este gen se encuentra dentro de la región que codifica a los componentes del complemento C2, factor B y C4, así como LT- α (TNF- β)^{59,63}, conocidas como moléculas de clase III.

Figura 2. Localización del TNF- α dentro del MHC en el brazo corto del cromosoma 6.

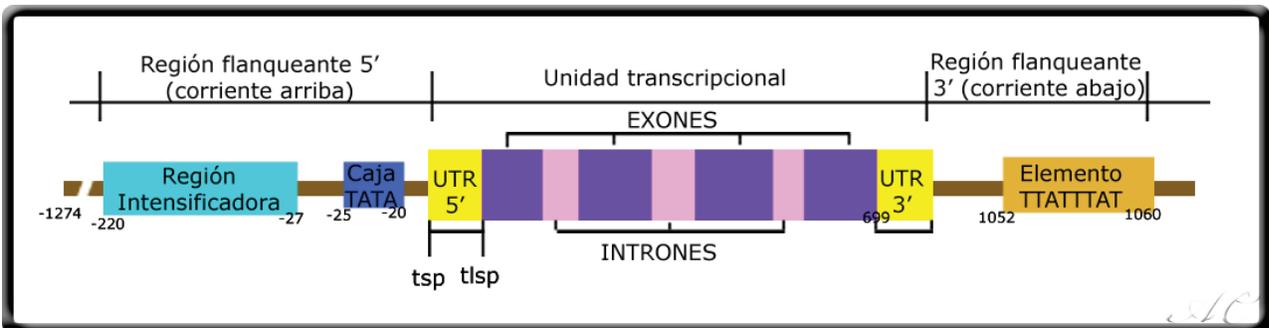


El gen que codifica al TNF- α humano presenta secuencias reguladoras (promotores e intensificadores) en la región flanqueante 5', adyacentes a la unidad transcripcional (ver Figura 3). En la región promotora, la RNA polimerasa II (pol II) se une a la caja TATA, localizada a -25 o -30 pares de bases (bp) corriente arriba a partir del punto inicial de la transcripción (tsp), que junto con un complejo multiproteico de factores transcripcionales constitutivos denominado TFIID, conducen la transcripción del gen y la maduración del RNA premensajero a RNA mensajero maduro. Se ha demostrado que mutaciones en la caja TATA reducen frecuentemente la transcripción y, a menudo, las deleciones alteran el punto de inicio de la transcripción⁵⁸⁻⁶².

Además, el gen para el TNF- α humano presenta secuencias intensificadoras (enhancers) corriente arriba 5' que tienen la capacidad de modular la actividad transcripcional del gen, a través de la regulación positiva o negativa de la acción del promotor⁶².

Y en su región flanqueante 3' corriente abajo contiene una secuencia TTATTTAT, característica de citocinas inflamatorias, que regula la estabilidad del RNAm y su traducción.

Figura 3. Organización del gen para TNF- α



- La región flanqueante 5' corriente arriba formada por: Región intensificadora (enhancers), secuencias de DNA moduladores y la región promotora con la caja TATA en donde las polimerasas de RNA se unen como parte del complejo de iniciación de la transcripción.
- Unidad Transcripcional: Presenta una secuencia no codificante 5' (UTR 5'), 3 secuencias intercaladas o intrones (que no están presentes en el producto final del RNAm) y 4 secuencias conservadas o exones (expresadas) y la secuencia no codificante 3' (UTR 3'). Se indica los puntos de iniciación de la transcripción (tsp) y traducción (tlsp).
- Región flanqueante 3' corriente abajo: formada por la región reguladora que presenta elementos ARE (AU-rich elements).

Varios reportes enfatizan la importancia de los primeros -220 nucleótidos corriente arriba dentro de la región promotora e intensificadora del gen para el TNF- α humano⁶⁰⁻⁶³. Esta región contiene elementos reguladores en cis (adyacentes al gen estructural que regulan), los cuales interaccionan con distintos factores de transcripción inducibles (por señales extracelulares), que dependiendo de su organización modular, regulan la iniciación de la transcripción génica (ver Figura 4). Algunas familias de factores transcripcionales inducibles más comunes que activan a células inmunes son: NFAT, NF- κ B/Rel (NF κ B1 o p50, NF κ B2 o p52, c-REL, REL A o p65 y REL B) y las familias de los factores bZIP (DNA-binding domain linked to a leucine zipper dimerization motif), como C/EBP β expresado únicamente en monocitos y macrófagos, que contribuyen en la regulación de la expresión de TNF- α de manera célula-específica⁶⁰. Estos factores inducibles cooperan con los factores constitutivos específicos de la célula y generan un complejo transcripcional activo.

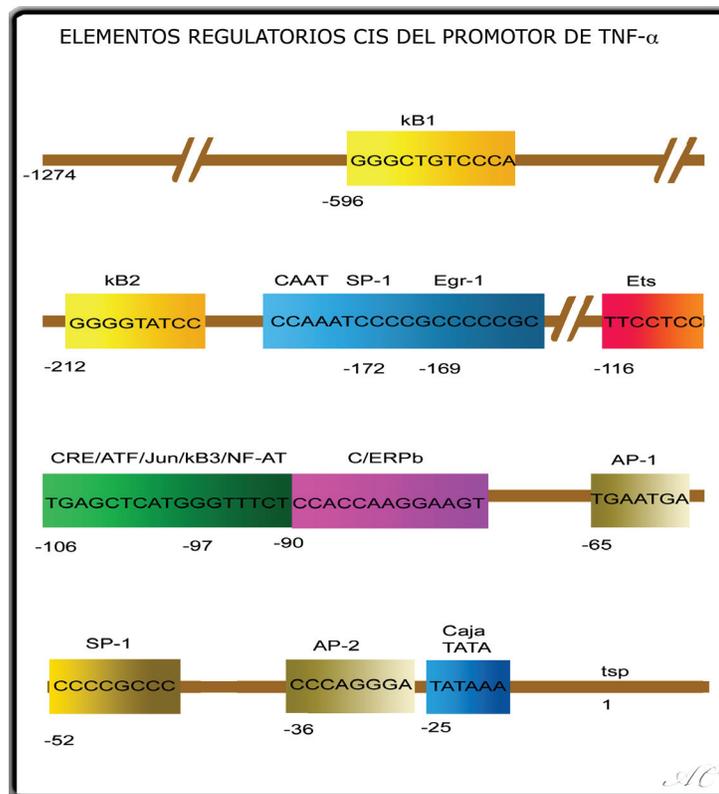


Figura 4. Elementos reguladores cis dentro de la región promotora del gen TNF- α humano, los números corresponden a la región flanqueante 5' en relación al sitio de inicio de la transcripción (tsp). En los sitios CRE (AMP response element) se unen los factores transcripcionales como ATF2/c-jun (miembros de la familia AP-1: c-Jun, JUN D, JUN B, ATF-2, C-Fos, FRA-1, FRA-2), sitios NF-AT donde se unen los factores NFAT, sitios κ 3 donde se unen miembros de la familia NF- κ B (NF κ B1 o p50, NF κ B2 o p52, c-REL, REL A o p65 y REL B). En el sitio CAAT se une el factor transcripcional C/EBP α - ζ (CAAT/enhancer-binding proteins). En el sitio Ets se unen los factores ETS-1 y ELK.

1.3.6 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN PARA TNF- α

El control de la expresión del TNF- α es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular, y este control es efectuado mediante múltiples estrategias⁶⁰. EL TNF- α exhibe una complejidad en su regulación y se considera que está jerarquizada. La transcripción del TNF- α está regulada a través de la producción y/o activación de factores de transcripción⁶¹⁻⁶⁹; además de la formación del complejo transcripcional (enhanceosoma)^{70,71}. Otro punto de regulación se encuentra a nivel postraduccional, el mensajero del TNF- α en su región UTR 3' contiene secuencias reguladoras que consisten en adenosina-uracilo (A-U), formando pentanucleótidos AUUUA en múltiplos (sitios referidos como elementos ricos en AU o ARE [AU-rich elements]^{70,71}), las cuales regulan la estabilidad del mensajero. Los sitios ARE de transcritos, que codifican citocinas, oncoproteínas, factores de crecimiento y de transcripción, han sido mapeados en su región UTR 3' y muestran afinidad por varias moléculas como: tristetraprolina^{63,71-73}, antígeno-1 intracelular de células T (TIA-1), y proteína relacionada a TIA-1, cuya actividad regula la estabilidad del mensajero y la traducción. También la expresión del TNF- α está regulada a nivel traduccional durante los procesos de corte y empalme (splicing), transporte del mensajero y rompimiento o maduración de la proteína. La importancia relativa de cada etapa de regulación es aún desconocida^{60,68}.

Sólo un estímulo ha sido investigado con respecto a lo anterior. El LPS, componente de la superficie de bacterias gram negativas, es un estímulo que induce la transcripción del TNF- α 5 veces más en comparación a la transcripción basal del TNF- α ; la estabilidad del mensajero es incrementada 12 veces con respecto a las no estimuladas y la traducción es incrementada de 2 a 3 veces. Esto sugiere que el LPS induce un incremento a nivel transcripcional, pero el efecto más potente es el incremento en la estabilidad del mensajero⁶⁴. No se conoce si estos hallazgos pueden ser generalizados a otros estímulos.

En el anexo B se describe más detalladamente los procesos, las moléculas y las vías de señalización involucrados en la regulación de la expresión génica del TNF- α en monocitos; y los distintos niveles de regulación: epigenética y transcripcional, postranscripcional y traduccional.

1.3.7 INHIBIDORES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL TNF- α

Se ha reportado diversos inhibidores de la síntesis del TNF- α en monocitos, como son los glucocorticoides (GR)⁷⁴, la IL-10⁷⁵⁻⁷⁷, el TGF- β ^{78,79} y la PGE₂⁸⁰⁻⁸², entre otros. Estos inhibidores presentan distintos mecanismos de acción (ver anexo C).

Glucocorticoides. La función principal de los GR's es la inhibición de la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria, a través de su interacción directa con el DNA (en los sitios nGRE) y/o por inhibición de los factores de transcripción necesarios para la síntesis de las moléculas inflamatorias (AP-1, NF- κ B). Otro mecanismo de inhibición es mediante la inducción de la expresión de IL-10.

Interleucina-10. Esta proteína supresora presenta una capacidad anti-inflamatoria. IL-10 al unirse a su receptor genera una cascada de señalización intracelular involucrada en la activación de algunos genes como SOCS (inhibidor fisiológico de INF- γ , este último inductor del TNF- α) y más IL-10. E inactivación del factor transcripcional NF- κ B; de este manera, reprime la transcripción del TNF- α .

TGF- β . El factor de crecimiento transformante (TGF- β) regula la transcripción génica por medio de la activación de proteínas intracelulares llamadas Smad, las cuales interaccionan directamente con el DNA, con factores de transcripción y con proteínas co-represoras transcripcionales que reclutan a desacetilasas de histonas, cuya actividad induce la condensación de la cromatina y por consiguiente la represión transcripcional.

PGE₂. La prostaglandina E₂ unida a su receptor EP4 regula la respuesta inflamatoria. Existen varios reportes que demuestran que la PGE₂ inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6 en macrófagos⁸⁴; se ha observado que la PGE₂ ejerce su efecto inhibitorio a nivel de proteína y expresión del RNAm para el TNF- α en macrófagos activados por LPS. El mecanismo por el cual la PGE₂ ejerce su efecto inhibitorio sobre la producción de citocinas pro-inflamatorias aún es desconocido; no obstante, se ha observado que su presencia se asocia con un incremento de la citocina inmunosupresora IL-10 y una disminución de IL-12⁸². Con respecto al cáncer pulmonar, se ha observado que los niveles de COX-2 se encuentran elevados (la síntesis de PGE₂ está regulada por la actividad enzimática de la ciclooxigenasa, COX-1 y COX-2), y este incremento de PGE₂ promueve la invasión y metástasis del carcinoma pulmonar¹⁰⁵.

2. ANTECEDENTES

2.1 MECANISMOS DE EVASIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES: RELACIÓN CON EL MACRÓFAGO

2.1.1 GENERALIDADES

Los macrófagos son prominentes en el infiltrado celular alrededor del tumor y pueden llegar a constituir más del 50% del total de la masa tumoral^{29,83}. La infiltración de las células mononucleares es considerada como una manifestación de la respuesta del huésped en contra del crecimiento tumoral⁸⁴. No obstante, la presencia de células inmunes infiltrantes en el tumor no asegura un pronóstico favorable para el huésped^{88,100,101}. Aunque los macrófagos median la citotoxicidad del tumor a través de varios mecanismos (expuestos anteriormente), estudios posteriores revelan disfunción de los macrófagos presentes en los sujetos con cáncer^{88,100,101}.

Entre las disfunciones de los macrófagos, se ha observado que estos pueden contribuir al crecimiento del tumor a través de factores de crecimiento como el aminoácido L-arginina derivado de poliaminas⁸⁸. La L-arginina es el sustrato molecular para la biosíntesis de la molécula citotóxica: óxido nítrico (NO). Algunos tumores limitan notablemente la producción intra-tumoral de NO mediante la reducción de la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa, lo cual favorece la formación de ornitina, que actúa como un factor de crecimiento requerido para la replicación celular⁸⁵. Usando este mecanismo, las células tumorales causan un decremento en la citotoxicidad del macrófago y promueven el crecimiento del tumor *in situ*⁸⁸.

Así mismo, existen datos experimentales que demuestran una relación directa entre la presencia de macrófagos con el crecimiento y la metástasis del tumor^{86,100,101}. Se conoce que los macrófagos asociados al tumor son potentes promotores de la angiogénesis^{100,101} (generación de nuevos capilares sanguíneos), a través de la producción de factores pro-angiogénicos como: el factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF), el TNF- α y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF). VEGF y bFGF estimulan la proliferación y migración de células endoteliales; además de la liberación de proteasas como: metaloproteasas de la matriz (MMP) y plasmina, que modifican las interacciones célula-matriz extracelular⁸⁸. La acción combinada resulta en la degradación de la membrana basal y otros componentes de matriz extracelular (ECM) y la desestabilización de la vascularidad local, lo que permite la migración y proliferación de células endoteliales. Esta actividad proteolítica también contribuye a la migración y extravasación de células tumorales durante el proceso de metástasis⁸⁷.

Por otra parte, se ha demostrado una relación-causal directa entre la presencia del tumor y la disfunción del sistema inmune^{88,100,101}. Recientes investigaciones sugieren que las bases celulares para la supresión inmunológica incluye la generación de macrófagos inmunoreguladores que inhiben la respuesta adaptativa de células T, mermando así sus funciones tumoricidas. Se ha postulado que los tumores utilizan una amplia variedad de mecanismos para evadir su detección y destrucción por el sistema inmune, incluyendo la liberación de citocinas y moléculas inhibitorias (IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β , PGE₂, M-CSF y factor de inactivación del macrófagos), así como alteraciones en la interacción de Fas-FasL. Los altos niveles de citocinas inhibitorias liberadas por las células tumorales trastornan el balance normal del sistema inmune, conduciendo a la alteración funcional del macrófago y a la inmunosupresión^{88,100,101}.

En este sentido, durante la migración al sitio del tumor, los macrófagos sensibilizados encuentran incrementada la concentración de señales de activación como son TAA's y proteínas del ECM, por lo que llegan a ser activados; pero, cuando los macrófagos activados, entran al microambiente del tumor, la presencia de las citocinas derivadas del tumor inhiben la producción de moléculas citotóxicas de los macrófagos. También, durante el crecimiento del tumor, los macrófagos pueden afectar adversamente la respuesta del huésped; ya que se ha observado que los macrófagos infiltrantes del tumor (TIM's) son usualmente clase II^{-/-} (la PGE₂ liberada por el tumor es la principal molécula inhibitoria de la producción de moléculas clase II del MHC), por lo tanto la falta de expresión de las moléculas clase II por los macrófagos disminuye la presentación de TAA's a las células T^{88,101}.

Otro mecanismo es la inhibición de la respuesta inmune tipo T_H1. Las moléculas inhibitorias derivadas del tumor como IL-4, IL-10, TGF- β y PGE₂ suprimen la respuesta celular tipo T_H1, la cual induce las acciones tumoricidas del macrófago^{88,101}.

La IL-10, derivada del tumor, inhibe la expresión de moléculas co-estimuladoras en los macrófagos, lo que impide la proliferación de los linfocitos. Además inhibe la producción de moléculas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1) en macrófagos a nivel transcripcional, ya que impide la translocación del factor NF- κ B hacia al núcleo y por tanto la transcripción de los genes pro-inflamatorios⁷⁵.

En suma, el tumor produce o bien induce en los macrófagos la producción de TGF- β , IL-10 y PGE₂, moléculas anti-inflamatorias, que suprimen la síntesis de moléculas efectoras como el TNF- α y afectan la proliferación de las células T.

2.2.1 EN EL CÁNCER PULMONAR

En relación al cáncer broncogénico de células no pequeñas (NSCLC), algunos informes han indicado la presencia de células inmunes: 2/3 partes son linfocitos, 1/3 son macrófagos, un bajo porcentaje son células dendríticas y existen escasas células NK, lo que sugiere un papel importante de éstas en los mecanismos inmunológicos de defensa contra el desarrollo del cáncer pulmonar^{89,102}. Sin embargo, se ha observado que las células tumorales presentan una marcada disminución en la expresión de moléculas de clase I y II del MHC como mecanismo de evasión a la respuesta inmune^{88,101}.

Otros reportes experimentales muestran que la mitad de los TIM's tienden a ser potencialmente citotóxicos a través del receptor Fcγ (citotoxicidad dependiente de anticuerpos) y TNF-α; aunque, a pesar de existir una clara evidencia de que el TNF-α media directamente la muerte de células tumorales¹⁰⁸, datos experimentales muestran que las células tumorales inducen una disminución en la secreción de ésta molécula, así como de las citocinas IL-1, IL-6, IL-2 y IL-12, lo cual impide la activación de células NK y linfocitos tipo T_H1⁹⁰.

Adicionalmente, las células tumorales inducen la liberación de IL-10 y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) por los TIM's. PDGF pueden inducir angiogénesis. Y todo en conjunto puede contribuir a favorecer el crecimiento y desarrollo del tumor.

Se ha descrito que la adición exógena de TNF-α a macrófagos puede favorecer su actividad antitumoral^{115,117}; sin embargo, se ha mencionado que el TNF-α en ciertos tipos de tumores favorece el crecimiento tumoral¹¹⁵⁻¹¹⁷, debido a que algunos tumores muestran una producción constitutiva del TNF-α, dichos reportes sugieren la existencia de una estimulación autócrina por esta molécula⁹¹.

Otro mecanismo de evasión que reduce la susceptibilidad del tumor a los efectos citotóxico/citostáticos del TNF-α, es la liberación de receptores para TNF-α por las células tumorales⁹². En este sentido, se ha identificado formas solubles de receptores tipo I y II en diversos fluidos biológicos de pacientes con varios tipos de cáncer⁹³. De esta forma, se ha propuesto que las formas solubles de estos receptores se encuentran neutralizando la actividad biológica del TNF-α *in vivo*⁹⁴.

También, se ha demostrado que líneas celulares humanas derivadas de tumores pulmonares, tipo adenocarcinoma y carcinoma epidermoide, liberan factores solubles que alteran la secreción del TNF-α por los monocitos de sujetos sanos *in vitro*. Asimismo, estas líneas tumorales se muestran insensibles a la acción citotóxica de TNF-α recombinante humano (hTNF) debido a la falta de expresión de los receptores TNFR-I y/o TNFR-II. No obstante, algunas líneas tumorales no son sensibles al TNF-α aun cuando presentan los receptores⁹⁵; lo cual sugiere que, mientras algunas células tumorales liberan factores solubles inmunosupresores que inhiben la producción de TNF-α,

algunos determinantes antigénicos de membrana no bien caracterizados en las células tumorales son capaces de estimular, en los monocitos, la liberación del TNF- α debido a un contacto membrana-membrana induciendo la expresión del RNAm para TNF- α .

El derrame pleural generado de pacientes con el tipo histológico adenocarcinoma, contiene abundantes células tumorales y células inmunocompetentes, que permite el estudio de la respuesta celular antitumoral y de los mecanismos de evasión por este tipo histológico de cáncer pulmonar. Existen reportes en pacientes con cáncer pulmonar que demuestran, la alta producción de TNF- α asociada a bajo índice de metástasis^{116,117}. De manera contraria, otros autores han detectado disminución del TNF- α en el derrame pleural maligno, comparado con el derrame pleural de origen tuberculoso⁹⁶.

En el Laboratorio de Cáncer Pulmonar del INER, se han realizado estudios de derrames pleurales malignos en torno a la cuantificación de monocitos productores de TNF- α intracelular y se ha demostrado una reducción de la población productora de TNF- α , comparado con los monocitos de sangre periférica de los mismos pacientes y de éstos con sujetos sanos⁹⁷.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer pulmonar es la principal causa de muerte a nivel mundial, ocurren más de un millón de muertes anuales. A pesar de los grandes esfuerzos hechos por buscar nuevas estrategias terapéuticas que ayuden a la erradicación del cáncer pulmonar, éstas no muestran resultados satisfactorios. En parte, lo anterior podría deberse a la incompleta comprensión de las interacciones que se establecen entre el sistema inmune y el cáncer. Por ello ha sido necesario estudiar diversos aspectos biológicos en torno a la relación entre el cáncer pulmonar y la respuesta inmune. Dentro de éstos es importante profundizar en el conocimiento de los mecanismos de evasión empleados por los diferentes tipos histológicos de carcinoma pulmonar, frente a la actividad celular citotóxica/citostática presentada por las células de tipo monocito/macrófago, cuya presencia dentro de los infiltrados tumorales es vasta en número. Como un primer acercamiento a este fenómeno, se estudiará el efecto causado por las líneas celulares tipo adenocarcinoma (SK-LU-1 y 3B1A) y el tipo carcinoma epidermoide (SK-MES-1 y CALU-1), las cuales representan a los tipos histológicos de mayor incidencia en la población mexicana. Se empleará un modelo celular tipo monocito/macrófago (U-937) que permita estimar a qué nivel biológico suceden los cambios en la expresión del TNF- α . Es decir, si éstos ocurren a nivel de la expresión del RNAm y/o proteína (intracelular y de membrana). El contar con este tipo de sistema biológico, nos permitirá definir si el mecanismo de evasión para TNF- α es un fenómeno exclusivo del tipo histológico o es un comportamiento general del cáncer pulmonar. Este conocimiento será de importancia en el diseño de mejores estrategias terapéuticas.

4. OBJETIVO

Determinar el nivel biológico en el cual se altera la expresión del TNF- α (RNAm y/o proteína) en un modelo celular tipo monocito (U-937), ocasionada por la interacción con las líneas celulares de carcinoma pulmonar, en un sistema *in vitro*.

5. HIPÓTESIS

La línea celular tipo monocito/macrófago U-937 en contacto con las líneas celulares de carcinoma pulmonar mostrará cambios en la expresión del TNF- α , ya sea a nivel del RNAm y/o a nivel de la proteína intracelular y/o del TNF- α de membrana.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

- Realizar co-cultivos entre las células tumorales (adenocarcinoma o carcinoma epidermoide) y las células tipo monocito U-937 que favorezcan las interacciones celulares mediadas por el contacto membrana-membrana y/o por factores solubles.
- Posterior al co-cultivo con las líneas tumorales, las células tipo monocito U-937 se estimularon con PMA para amplificar la expresión del TNF- α (RNAm y proteína).
- Determinar de forma comparativa los cambios en la expresión del TNF- α presentados por los monocito U-937 provenientes del co-cultivo con las líneas tumorales en comparación con las células monocito U-937 control (ausentes de las interacciones con las células de carcinoma pulmonar), para ambas condiciones experimentales: basal y estimuladas por el PMA.

A los tres niveles celulares:

- (i) RNAm para TNF- α (determinado por RT-PCR)
- (ii) TNF- α intracelular (detectado por inmunofluorescencia y citometría de flujo)
- (iii) TNF- α de membrana (detectado por inmunofluorescencia y citometría de flujo)

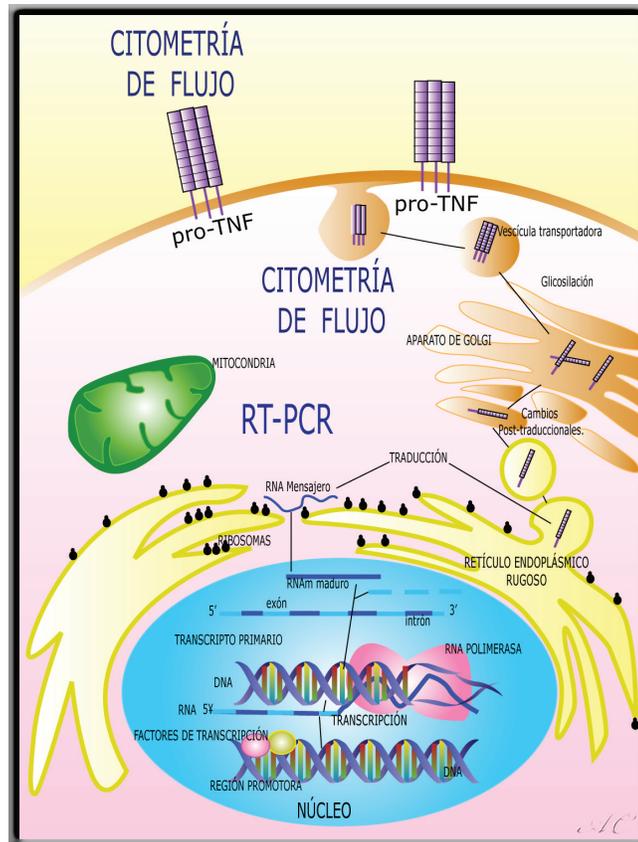


Figura 5. Estrategia experimental

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 REACTIVOS Y ANTICUERPOS

Reactivos

Medio de cultivo RPMI-1640, suero fetal bovino de ternera (FBS), brefeldina A (BFA), ionomicina, forbol-miristato-acetato (PMA), dimetilsulfóxido (DMSO), albúmina sérica bovina (BSA), azida de sodio (NaN_3), obtenidos de Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Tripsina obtenida de In Vitro (DF, México). Solución salina de FACS, solución FACS de lisis 10X y solución FACS permeabilizante, obtenidos de Becton-Dickinson (San José, CA, USA). En el anexo E se presenta la preparación de los reactivos.

Para biología molecular: reactivo TRIzol, Taq DNA polimerasa, amortiguador para PCR, MgCl_2 , dNTP's, transcriptasa reversa M-MLV, inhibidor de ribonucleasas, oligonucleótidos de amplificación para TNF- α (sentido 5'acaagcctgtagcccatgtt 3', anti sentido 5'aaagtagacctgcccagact 3') y β -actina (sentido 5'gggtcagaaggattcctatg 3' y anti sentido 5'ggtctcaaacatgatctggg 3') obtenidos de GIBCO, BRL (Grand Island, NY, USA). Marcadores de peso molecular para DNA de 19 -1114 bp obtenidos de Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN, USA). El diseño de los oligonucleótidos para detectar el RNAm de TNF- α se realizó de acuerdo a la secuencia del cDNA reportada por Wang A. M. y cols. (1985)⁴³, y para β -actina humana a partir del cDNA reportado en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Anticuerpos

Anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 anti-CD45 humano conjugado con PerCP (Clona 2D1), control de isotipo IgG1-FITC (clona X40) obtenido de Becton-Dickinson (San José, CA, USA); anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 anti-TNF- α humano conjugado con FITC (clona 6402.31) obtenido de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

7.2 LÍNEAS CELULARES

Se emplearon cuatro líneas tumorales humanas de origen pulmonar pertenecientes al grupo de células no pequeñas (NSCLC). Dos líneas tipo adenocarcinoma pulmonar: la línea SK-LU-1 obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA, y la otra línea tumoral aislada del derrame pleural de un paciente con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar, libre de tratamiento, designada 3B1A. Además se emplearon dos líneas tipo carcinoma epidermoide: SK-MES-1 y CALU-1, ambas obtenidas de la ATCC.

Las cuatro líneas tumorales presentan crecimiento en forma adherente, por lo que se trataron con una mezcla de tripsina 0-25%/verseno 0.02% adquirida de In vitro (D.F., México) y agitación mecánica para favorecer su desprendimiento. Igualmente, se empleó la línea celular U-937 (linfoma histiocítico humano), adquirida de la ATCC, utilizada como representativa de monocitos, cuyo crecimiento es en suspensión. Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio RPMI-1640 conteniendo 10% (v/v) de FBS y 1% (v/v) de mezcla de antibióticos (100 μ g/mL de estreptomina y 100 U/mL de penicilina G sódica), al cual nos referiremos con medio RPMI-1640 suplementado. Al formar confluencia, las líneas celulares adherentes fueron tripsinizadas y las células en suspensión fueron sub-cultivadas cada tercer día. La viabilidad celular se mantuvo superior al 93-94% al momento de realizar los experimentos y fue determinada mediante la exclusión por tinción con azul tripano obtenido de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. USA). Los cultivos celulares fueron mantenidos en cámara de incubación húmeda con 5% de CO₂ a 37 °C.

7.3 CONDICIONES DEL CO-CULTIVO

Se realizaron co-cultivos en cajas T-180 cm², adicionando 1 x10⁷ células tumorales y 2 x10⁶ células U-937 tipo monocítico en 40 mL de medio suplementado (relación celular 5:1). Los cultivos celulares fueron incubados por 24 h; tras lo cual, las células U-937 fueron recuperadas. Como control se incluyeron, células U-937 a la densidad celular final del co-cultivo (3 x10⁵ células/mL). Posteriormente, las células U-937 recuperadas se cultivaron por distintos periodos, en ausencia o presencia de diferentes estímulos y tiempos indicados en cada experimento.

7.4 EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL.

La extracción del RNA total se realizó por el método de fenol-cloroformo isotiocianato de guanidina empleando el reactivo TRIzol⁹⁸. Posterior al co-cultivo, las células U-937 se estimularon con PMA por 2 h; posteriormente, se centrifugó retirando el sobrenadante para resuspender el botón celular en 1 mL de solución TRIzol, se almacenaron a -70°C durante toda la noche y posteriormente se añadió 200 μ L de cloroformo agitando vigorosamente en el vortex. Después de centrifugar a 4 °C se recuperó la fase acuosa, a partir de ésta, se precipitó el RNA total con 1 mL de isopropanol a temperatura ambiente (T A) durante 45 min, se centrifugó y la pastilla de RNA se lavó tres veces con etanol frío al 70% (v/v). La pastilla de RNA se dejó secar moderadamente a T A resuspendiéndola en 25 μ L de agua estéril libre de RNAsas, para su posterior cuantificación por espectrofotometría a 260/280 nm.

7.5 AMPLIFICACIÓN DEL RNAm POR RT-PCR

Los RNAm's para TNF- α y β -actina se amplificaron mediante la técnica de RT-PCR, bajo las condiciones que se resumen a continuación. Primero el cDNA fue obtenido a través de la reacción de retrotranscripción (RT), a partir de 1.0 μ g de RNA total transferido a un tubo para PCR de 0.2 mL.

Éste se mezcló con buffer PCR 10X (200 mM Tris HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 6.7 mM de MgCl₂, 1.33 mM de dNTP's (desoxirribonucleósidos trifosfatos), 1.6 U de inhibidor de ribonucleasas, 0.8 nmol del oligo-dT (DNA corto de cadena sencilla formado sólo por desoxitimidina), 6.7 mM DTT y 32 U de la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus). Los tubos fueron incubados en el termociclador Touchdown, Hybaid, Ashford, UK, durante 60 min a 42 °C.

La reacción de PCR fue realizada en buffer PCR 10X, 0.433 mM de MgCl₂, 0.5 U de Taq DNA polimerasa y 94 pmol/μL de cada serie de primer (TNF-α o β-actina como control interno). Después de un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 min, las condiciones de amplificado fueron: 30 ciclos a 94 °C por 50 segundos, 60 °C por 50 segundos y 72 °C por 50 segundos, finalmente a 72 °C por 7 min. Para β-actina se obtuvo un amplicon de 237 pb y para TNF-α uno de 427 pb. Los productos de amplificación y marcadores de peso molecular fueron resueltos en geles de agarosa al 1.5% y TBE al 0.25 X, empleando bromuro de etidio para su visualización.

La expresión del RNAm para TNF-α se determinó de manera semi-cuantitativa analizando la absorbancia relativa de la banda y normalizando con respecto al amplificado de β-actina. Esta relación densitométrica se designó como índice de relación (IR). El amplificado de β-actina sirvió además como indicador de carga. Para ello se empleó el software para windows versión 2.1.

7.6 DETECCIÓN DE TNF-α POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Posterior al co-cultivo, las células se ajustaron a una densidad celular de 3 x10⁵ células/mL en medio RPMI-1640 suplementado y se les adicionó el estímulo correspondiente como se indica en la Tabla A, por un lapso de 4 h a 37 °C. Como controles de la expresión basal del TNF-α de membrana o TNF-α intracelular, se incluyeron células U-937 no estimuladas.

Tratamiento	TNF-α de Membrana		TNF-α Intracelular	
	No Estimulado	Estimulado	No Estimulado	Estimulado
Brefeldina	-	-	20 μL	20 μL
Ionomicina	-	-	-	20 μL
PMA	-	25 μL	-	25 μL

Tabla A. Condiciones para la determinación de TNF-α de membrana e intracelular en células tipo monocito U-937.

Al término del estímulo correspondiente, la suspensión celular fue centrifugada a 4 °C, se lavó y se resuspendió en solución amortiguadora PBS 1X con 0.5% de albúmina bovina y 0.1% de azida de sodio. Para distinguir células U-937 de células tumorales se realizó la tinción de la molécula CD45 (marcador de células hematopoyéticas), adicionando 5 μ L de anti-CD45 conjugado con PerCP, se incubó por 30 min a 4 °C, en oscuridad y con agitación suave. Como control de autofluorescencia (blanco) se incluyó células en ausencia del anticuerpo anti-CD45-PerCP y como control de isotipo células en presencia del anticuerpo monoclonal de ratón IgG1-FITC (clona X40). Se realizó la fijación del anticuerpo, adicionando solución FACS de lisis 1X (p-formaldehído) a cada tubo por 10 minutos a T A protegidos de la luz. El paquete celular se centrifugó y se lavó con amortiguador PBS con 0.5% de albúmina y 0.1% de azida de sodio y, según el caso se realizó: (a) tinción de membrana o (b) tinción intracelular, como se indica a continuación:

Tinción de TNF- α de membrana

En las distintas condiciones de cultivo y estímulo (Tabla A), la suspensión celular se incubó con 5 μ L de anticuerpo anti-TNF- α conjugado con FITC. Se procede como se indica para la tinción de CD45. Como controles se incluyeron. *i*) células en ausencia de anticuerpo anti-TNF- α -FITC (autofluorescencia), y *ii*) control de isotipo IgG1-FITC. Para finalizar, las células se resuspendieron en solución salina FACS y se adquirieron 10,000 eventos, empleando un citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el Software CellQuest para su análisis.

Tinción de TNF- α intracelular

La suspensión celular control y del co-cultivo, no estimuladas y estimuladas con PMA, BFA e ionomicina (ver Tabla A), se incubaron en solución permeabilizadora por 10 min a T A en oscuridad. Posterior a ello, se lavaron con amortiguador PBS con 0.5% de albúmina bovina y 0.1% de azida de sodio. Las células se resuspendieron en 5 μ L de anticuerpo anti-TNF- α e incubaron durante 30 min a T A protegidas de la luz. Después se lavaron con amortiguador PBS con 0.5% de albúmina bovina y 0.1% de azida de sodio y se fijaron con solución FACS de lisis 1X (p-formaldehído) por 10 minutos a T A en oscuridad. Se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en solución salina de FACS. Como controles se incluyeron células permeabilizadas: *i*) en ausencia del anticuerpo anti-TNF- α -FITC (autofluorescencia) y *ii*) en presencia del control de isotipo IgG1-FITC. Para la adquisición y análisis se capturaron 10,000 eventos, utilizando el Software CellQuest.

8. RESULTADOS

8.1 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RNAm PARA TNF- α POR EL MÉTODO DE RT-PCR

8.1.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES

a) **Concentración del estímulo PMA**

Para la estimulación de la línea celular U-937, a una densidad de 3×10^5 células/mL, se empleó PMA a una concentración de 25 ng/mL. La concentración de PMA fue elegida a partir de una curva de estimulación utilizando diferentes concentraciones del estímulo: 5, 10, 20, 25, 50 y 100 ng/mL durante 2 h de incubación. Bajo las condiciones de amplificación del RT-PCR (ver materiales y métodos) se observó que a partir de la concentración de 20 ng/mL del estímulo es posible apreciar un aumento del RNAm, en comparación con el nivel basal del RNAm para TNF- α de la población celular U-937 (datos no mostrados). En el anexo D se presenta la cascada de señalización inducida por el PMA en monocitos.

b) **Tiempo de estimulación**

El tiempo de estimulación de 2 h fue determinado en función de un ensayo de cinética, en el cual se observó que a partir de 30 min se incrementó la expresión del RNAm para TNF- α y se mantuvo casi constante hasta las 22 h después del estímulo.

c) **Relación celular del co-cultivo**

Se estableció la relación celular 5:1 (células tumorales/monocitos U-937). Esta relación nos permitió observar las alteraciones en la expresión del RNAm para TNF- α por efecto del co-cultivo. Además, para descartar la posibilidad de que esta relación celular se inclinase a favorecer las alteraciones sobre la expresión del RNAm para TNF- α se probó otra relación celular 2:1; donde se observó, que a esta relación menor, el efecto de la alteración sobre la expresión del RNAm para TNF- α se sigue presentando.

8.1.2 Expresión del RNAm para TNF- α en células U-937 co-cultivadas con células tumorales de distintas líneas de carcinoma pulmonar

1) Efecto de la línea tumoral SK-MES-1

En condición basal, la línea celular tipo monocito U-937, después de ser recuperada del co-cultivo con la línea celular SK-MES-1 (carcinoma epidermoide), mostró un índice de relación densitométrico* (IR = 2.0) menor al IR obtenido por la población U-937 control (IR = 2.7).

Con respecto a la condición estimulada con PMA se observó un efecto similar al anterior. La población monocítica U-937, co-cultivada con la línea tumoral SK-MES-1, presentó un IR de 3.4 menor al IR de 4.3 presentado por la población U-937 control estimulada. En la Figura 6 se muestra la semicuantificación del RNAm para TNF- α de un ensayo de RT-PCR representativo de 3 experimentos realizados de manera independiente (n=3).

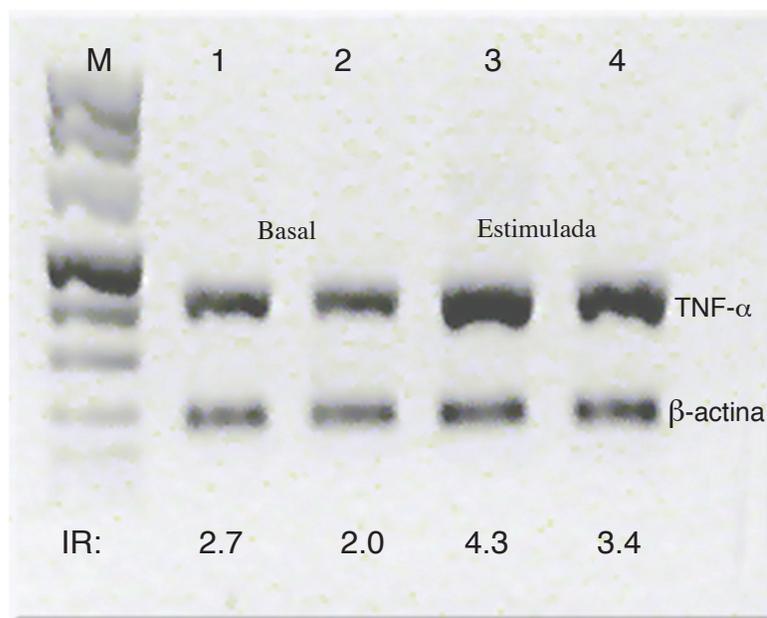
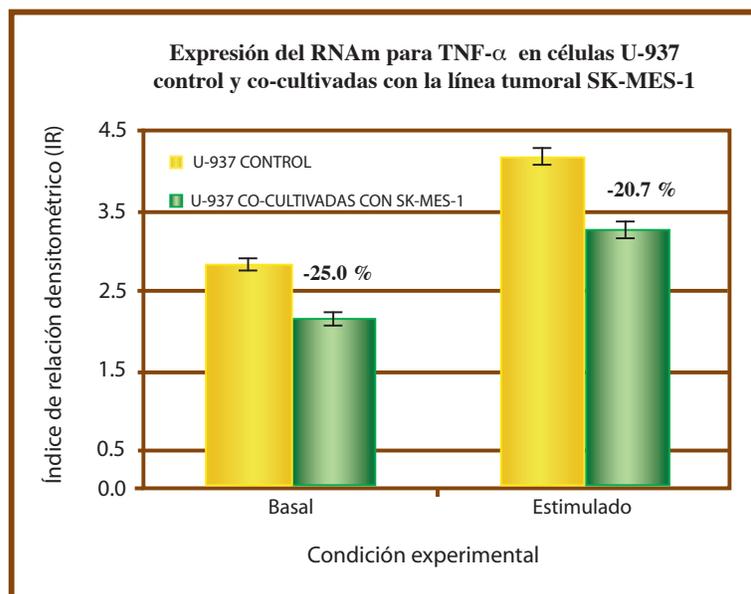


Figura 6: RT-PCR. Expresión basal e inducible con PMA de RNAm para TNF- α de monocitos control y en co-cultivo con la línea SK-MES-1. Carriles: 1) U-937 control expresión basal. 2) U-937 co-cultivo expresión basal. 3) U-937 control expresión estimulada. 4) U-937 co-cultivo expresión estimulada.

Por otra parte, también se observó el efecto de la estimulación celular mediada por el PMA en la población U-937 control, como control interno del estímulo. En este ensayo la población monocítica U-937 control mostró un IR de 2.7 y después de ser estimulada con PMA su IR fue de 4.3, por lo que el incremento promedio (n=3) fue del 55 ± 10 %.

*El índice de relación densitométrico (IR) representa la densidad óptica relativa de la banda amplificada para TNF- α normalizado con respecto al amplificado de β -actina.

En la gráfica 1 se muestra la diferencia porcentual entre la población monocítica U-937 control y la población U-937 obtenida del co-cultivo con SK-MES-1 en ambas condiciones, basal y estimulada. La diferencia porcentual⁴ es calculada a partir de los índices de relación densitométrica promedio de los tres experimentos realizados (n=3) para cada condición empleada.



Gráfica 1. Diferencia porcentual entre los IR's de las poblaciones celulares U-937 control y U-937 provenientes del co-cultivo con SK-MES-1.

2) Efecto de la línea tumoral CALU-1

En condición basal, la población celular U-937 en co-cultivo con la línea tumoral CALU-1 (carcinoma epidermoide) presentó un IR de 2.8 y la población monocítica U-937 control presentó un IR de 2.5, lo cual indica un ligero incremento respecto al control.

Asimismo, en condición estimulada y después del co-cultivo con CALU-1, la población monocítica U-937 mostró un IR de 3.6 ligeramente mayor al IR de 3.2 obtenido por la población U-937 control estimulada.

⁴ La diferencia porcentual (%) fue obtenida por la fórmula:

$$\% = \left[\frac{\text{IR co-cultivo} - \text{IR control}}{\text{IR control}} \right] \times 100$$

En la Figura 7 se muestra un ensayo de RT-PCR representativo de 2 experimentos realizados de manera independiente (n=2).

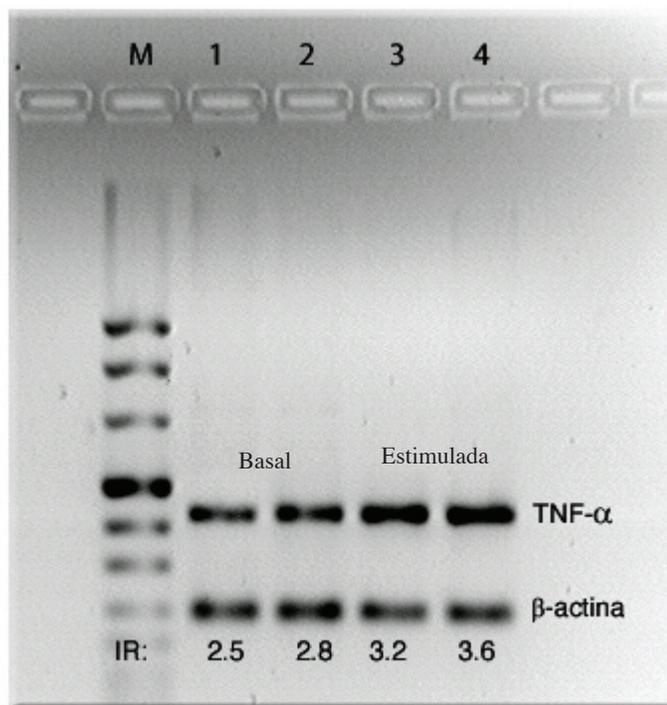
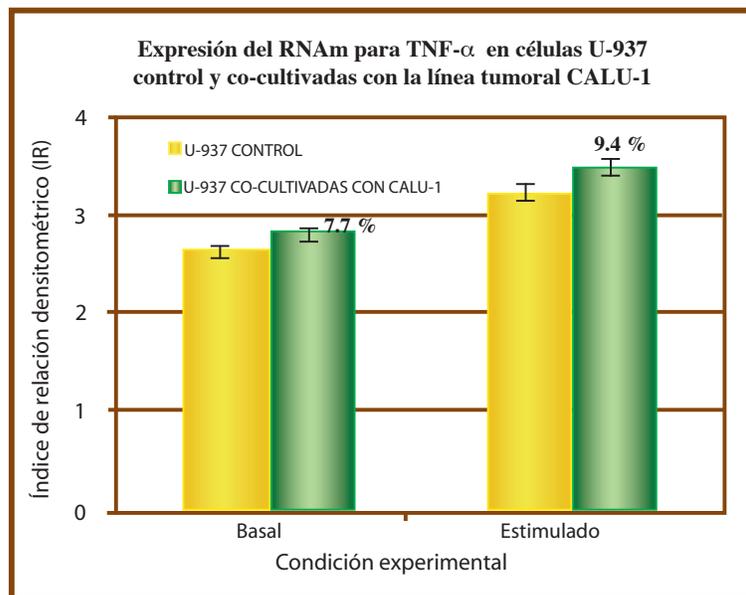


Figura 7: RT-PCR. Expresión basal e inducible con PMA de RNAm para TNF- α de monocitos control y en co-cultivo con la línea CALU-1. Carriles: 1) U-937 control expresión basal. 2) U-937 co-cultivo expresión basal. 3) U-937 control expresión estimulada. 4) U-937 co-cultivo expresión estimulada.

Por otro parte, como control interno del estímulo celular se observó el efecto de la estimulación mediada por el PMA en la población U-937 control. En este ensayo la población monocítica U-937 control mostró un IR de 2.5 y después de ser estimulada con PMA su IR fue de 3.2, por lo que el incremento promedio (n=2) fue del $32\pm 4\%$.

En la gráfica 2 se muestra la diferencia porcentual promedio (n=2) entre los IR's de la población monocítica U-937 control y de la población U-937 proveniente del co-cultivo con CALU-1, para ambas condiciones, basal y estimulada.



Gráfica 2. Diferencia porcentual entre los IR's de las poblaciones celulares U-937 control y U-937 provenientes del co-cultivo con CALU-1.

3) Efecto de la línea tumoral SK-LU-1

En condición basal y posterior al co-cultivo con la línea tumoral SK-LU-1 (tipo adenocarcinoma), la población monocítica U-937 presentó ligeros cambios entre los IR's. Las células en co-cultivo mostraron un IR de 2.6 semejante al IR de 2.5 presentado por la población monocítica U-937 control.

En condiciones de estimulación, también se presentó el mismo comportamiento anterior. La población monocítica U-937 co-cultivada con SK-LU-1 y estimulada, mostró un IR de 2.9 semejante al IR de 3.0 presentado por la población U-937 control. Es decir, se observaron cambios mínimos en la expresión del RNAm para TNF- α . Se realizaron dos ensayos independientes bajo las mismas condiciones experimentales mostrando reproducibilidad en los mismos.

En la Figura 8 se muestra un experimento de RT-PCR representativo de dos ensayos realizados de manera independiente (n=2).

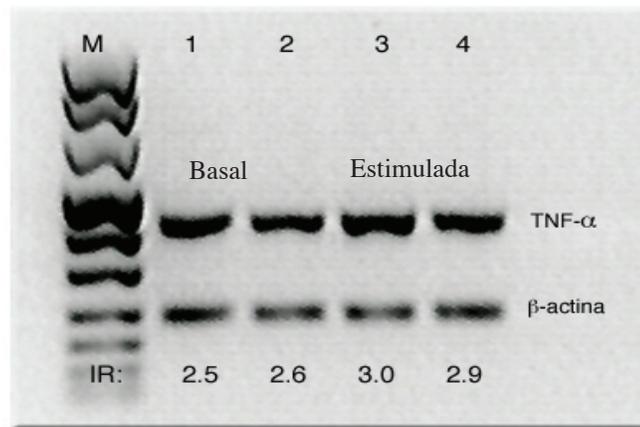
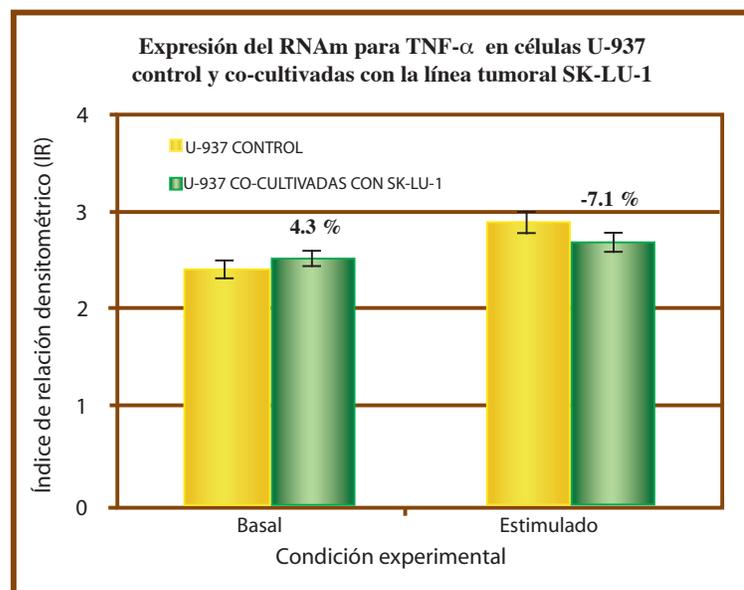


Figura 8: RT-PCR. Expresión basal e inducible con PMA de RNAm para TNF- α de monocitos control y en co-cultivo con la línea SK-LU-1. Carriles: 1) U-937 control expresión basal. 2) U-937 co-cultivo expresión basal. 3) U-937 control expresión estimulada. 4) U-937 co-cultivo expresión estimulada.

Por otro lado, como control interno del estímulo celular se observó el efecto de la estimulación mediada por el PMA en la población U-937 control. En este ensayo la población monocítica U-937 control mostró un IR de 2.5 y después de ser estimulada con PMA su IR fue de 3.0, por lo que el incremento promedio ($n=2$) fue del 27 ± 5 %.

En la gráfica 3 se muestra la diferencia porcentual promedio ($n=2$) entre las IR's de las poblaciones estudiadas: U-937 control y U-937 co-cultivadas con SK-LU-1, para cada condición experimental, basal y estimulada.



Gráfica 3. Diferencia porcentual entre los IR's de las poblaciones celulares U-937 control y U-937 provenientes del co-cultivo con SK-LU-1.

4) Efecto de la línea tumoral 3B1A

En el estado basal, la población U-937 obtenida del co-cultivo con la línea celular 3B1A (tipo adenocarcinoma), mostró un IR de 1.9 menor al IR de 2.3 presentado por la población U-937 control.

En condiciones de estimulación con PMA se observó un patrón similar al del estado basal, la población monocítica U-937 co-cultivada con 3B1A presentó un IR de 1.7 inferior al IR de 3.0 presentado por la población U-937 control. En la Figura 9 se muestra un ensayo representativo de dos experimentos realizados de manera independiente (n=2).

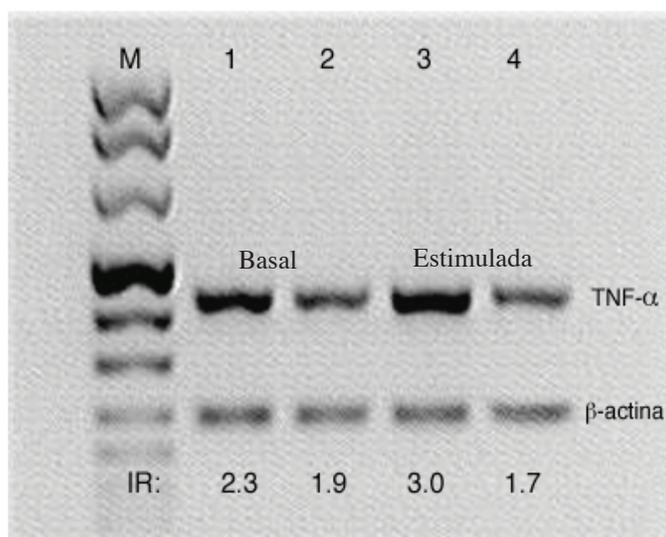
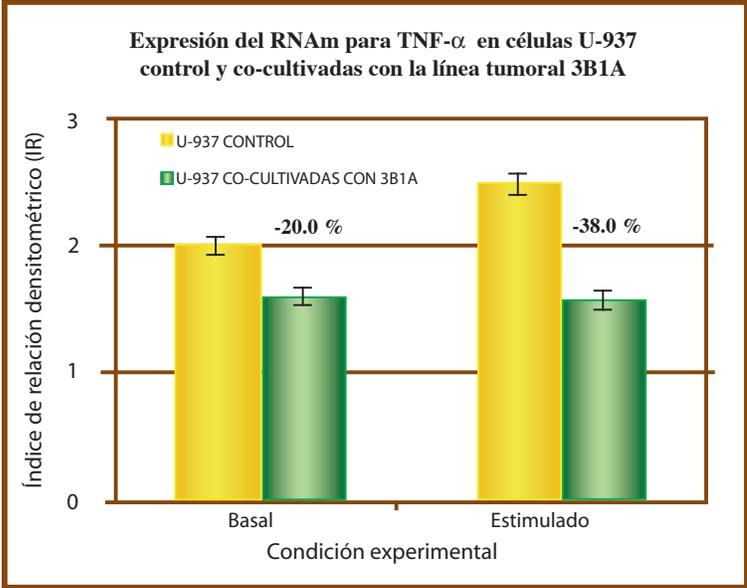


Figura 9: RT-PCR. Expresión basal e inducible con PMA de RNAm para TNF- α de monocitos control y en co-cultivo con la línea 3B1A. Carriles: 1) U-937 control expresión basal. 2) U-937 co-cultivo expresión basal. 3) U-937 control expresión estimulada. 4) U-937 co-cultivo expresión estimulada.

Por otro lado, como control interno del estímulo celular se observó el efecto de la estimulación mediada por el PMA en la población U-937 control. En este ensayo la población monocítica U-937 control mostró un IR de 2.3 y después de ser estimulada con PMA su IR fue de 3.0, por lo que se incrementó en un $30 \pm 6\%$.

En la gráfica 4 se muestra la diferencia porcentual promedio (n=2) entre los IR's de la población celular monocítica U-937 control y de la población U-937 obtenida del co-cultivo con 3B1A, para ambas condiciones, basal y estimulada.



Gráfica 4. Diferencia porcentual entre los IR's de las poblaciones celulares U-937 control y U-937 provenientes del co-cultivo con 3B1A.

8.2 DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA TNF- α POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA Y CITOMETRÍA DE FLUJO.

8.2.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES

a) Densidad celular

Se probaron diferentes densidades celulares de la línea tipo monocito U-937 para la detección de la proteína TNF- α y para la optimización del procedimiento de inmunotinción con el anticuerpo anti-TNF- α conjugado a FITC. Se decidió emplear la densidad de 3×10^5 células/mL para cada tratamiento, como se indica en materiales y métodos.

b) Concentración del estímulo PMA y tiempo de estimulación.

Para la determinación de la proteína de TNF- α intracelular y de membrana en las células U-937 en condiciones estimuladas, se utilizó PMA a la concentración anteriormente establecida, de 25 ng/mL por 3×10^5 células.

El tiempo de estimulación se determinó a través de una cinética de estimulación a diferentes tiempos: 1, 2, 4, 6 y 8 h de incubación a 37 °C. Los resultados (no mostrados) indicaron que los niveles de la proteína TNF- α intracelular y de membrana permanecieron constantes durante todo este lapso de tiempo, ya que no se observaron incrementos en la intensidad de fluorescencia con respecto a la intensidad dada por el nivel basal de la proteína en células no estimuladas (estado basal). Dado lo anterior, y con base en los tiempos de estimulación en monocitos sanguíneos utilizados en el laboratorio, así como de los reportados en la literatura, se decidió evaluar la intensidad de fluorescencia para la proteína TNF- α intracelular y de membrana a las 4 h de estimulación con PMA.

8.2.2 DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA TNF- α INTRACELULAR EN MONOCITOS U-937

Posterior al co-cultivo con las líneas celulares de carcinoma pulmonar, la población monocítica U-937 no modificó su autofluorescencia con respecto a la autofluorescencia de la población U-937 control, este comportamiento se observó en ambas condiciones experimentales, basal y estimulado (Figura 10, A y B). Además ambas poblaciones mostraron homogeneidad en el tamaño y en la granularidad. Por otra parte, para la cuantificación de la proteína citoplasmática del TNF- α en los monocitos U-937 se consideró como valor representativo la intensidad media geométrica de fluorescencia (IMF).

1) Efecto de la línea tumoral SK-MES-1

En el estado basal, se observó que la población U-937 co-cultivada con la línea tumoral SK-MES-1 presentó una disminución en la IMF de 157 en comparación con la obtenida de la población U-937 control (IMF=192), ver Figura 10A. La diferencia porcentual entre las IMF's de cada población estudiada fue del -18 %.

Asimismo, en condición de estimulación celular se observó que posterior al co-cultivo con células tumorales SK-MES-1, la población celular U-937 presentó una IMF de 206 menor en comparación con la IMF obtenida por la población U-937 control (IMF=290), ver Figura 10B. La diferencia porcentual entre las IMF's de cada población estudiada fue del -29 %.

Por otro lado, se observó el efecto de estimulación mediante PMA en la población U-937 control, en este ensayo la población monocítica U-937 control presentó una IMF de 192 y después de ser estimulada con PMA su IMF fue de 290 mostrando un incremento del 51%.

A continuación se presentan los resultados de un experimento representativo de tres ensayos realizados de manera independiente ($n = 3$). También se muestra la diferencia porcentual (%)[§] entre las IMF's de cada población estudiada: células U-937 control y en co-cultivo con la línea SK-MES-1.

TNF- α intracelular de U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral SK-MES-1

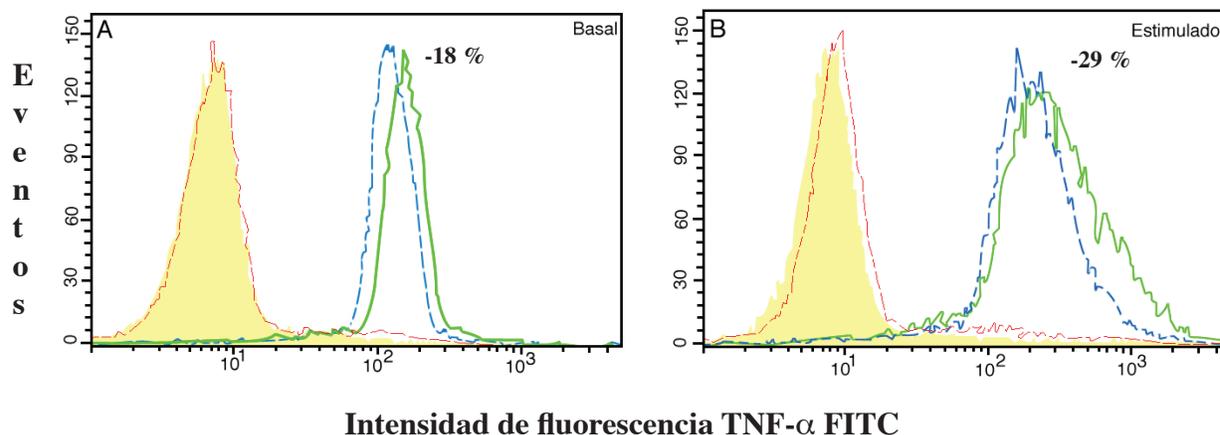


Figura 10. Citometría de Flujo. Se muestra las dos condiciones estudiadas: la población monocítica no estimulada o basal (A) y la población monocítica estimulada (B). La autofluorescencia causada por la población U-937 control se representa por el área amarilla y la autofluorescencia de las células U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral SK-MES-1 se representa con una línea discontinua roja. La fluorescencia debida al TNF- α intracelular de la población U-937 control se representa por la línea verde y la fluorescencia debida al TNF- α intracelular de la población U-937 en co-cultivo con SK-MES-1 se representa por la línea discontinua azul.

2) Efecto de la línea tumoral CALU-1

La población monocítica U-937 co-cultivada con la línea tumoral CALU-1, en el estado basal, mostró una IMF de 197 muy similar a la IMF presentada por la población U-937 control (IMF=199), ver Figura 11A. La diferencia porcentual entre las IMF's de cada población estudiada fue del 1 %.

De manera similar, después de la estimulación celular con PMA, la población celular U-937 proveniente del co-cultivo mostró un IMF de 254 semejante al IMF proveniente de la población U-937 control (IMF=253), ver Figura 11B. La diferencia porcentual entre las IMF's de cada población estudiada fue del 0.4 %. Lo anterior sugiere que la presencia de las células tumorales CALU-1 no inducen cambios en los niveles del TNF- α intracelular de las células U-937 provenientes del co-cultivo celular. Este patrón se observó en ambas condiciones experimentales, basal y estimulada.

En la Figura 11 se muestran los resultados de un experimento representativo de tres ensayos realizados (n=3).

TNF- α intracelular de U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral CALU-1

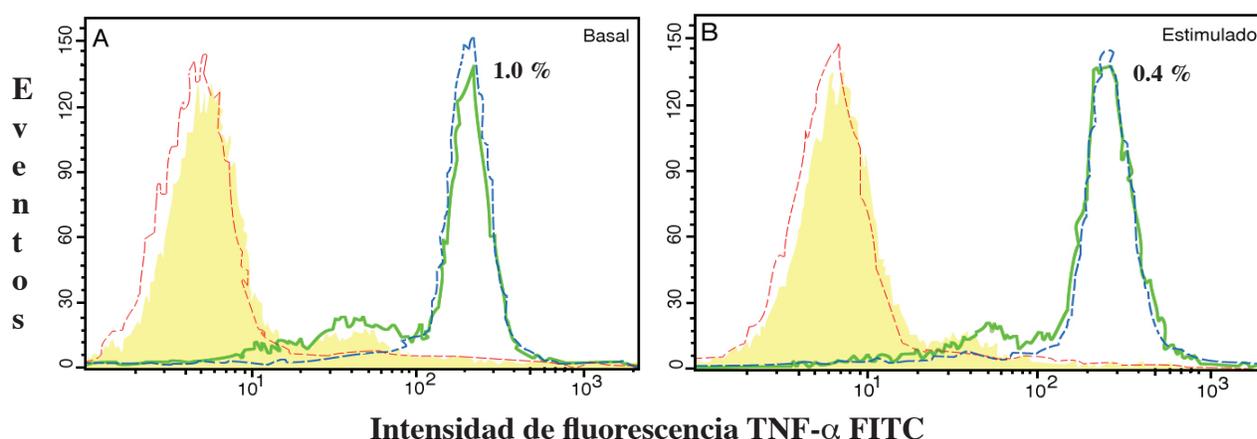


Figura 11. Citometría de Flujo. Se muestra las dos condiciones estudiadas: la población monocítica no estimulada o basal (A) y la población monocítica estimulada (B). La autofluorescencia causada por la población U-937 control se representa por el área amarilla y la autofluorescencia de las células U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral CALU-1 se representa con una línea discontinua roja. La fluorescencia debida al TNF- α intracelular de la población U-937 control se representa por la línea verde y la fluorescencia debida al TNF- α intracelular de la población U-937 en co-cultivo con CALU-1 se representa por la línea discontinua azul.

Por otro lado, se observó el efecto de estimulación mediante PMA en la población U-937 control, en este ensayo la población monocítica U-937 control basal presentó una IMF de 199 y después de ser estimulada con PMA su IMF fue de 253 mostrando un incremento del 27%.

[§] La diferencia porcentual (%) fue obtenida por la fórmula:

$$\% = \left[\frac{\text{IMF co-cultivo} - \text{IMF control}}{\text{IMF control}} \right] \times 100$$

3) Efecto de la línea tumoral SK-LU-1

Posterior al co-cultivo con la línea tumoral SK-LU-1, la población U-937 no estimulada (basal) mostró una IMF de 247 ligeramente mayor a la IMF obtenida por la población U-937 control (IMF=218). La diferencia porcentual entre las IMF's de cada población estudiada fue del 13% (Figura 12A).

De igual modo, se observó que la población celular U-937 proveniente del co-cultivo con SK-LU-1, después de ser estimulada, presentó una IMF de 279 ligeramente mayor a la IMF presentada por la población U-937 control (IMF=263). La diferencia porcentual entre las intensidades medias de cada población estudiada fue del 6% (Figura 12B).

Se realizaron dos ensayos independientes bajo las mismas condiciones experimentales (n=2), obteniendo resultados reproducibles. Un experimento representativo es presentado en la Figura 12.

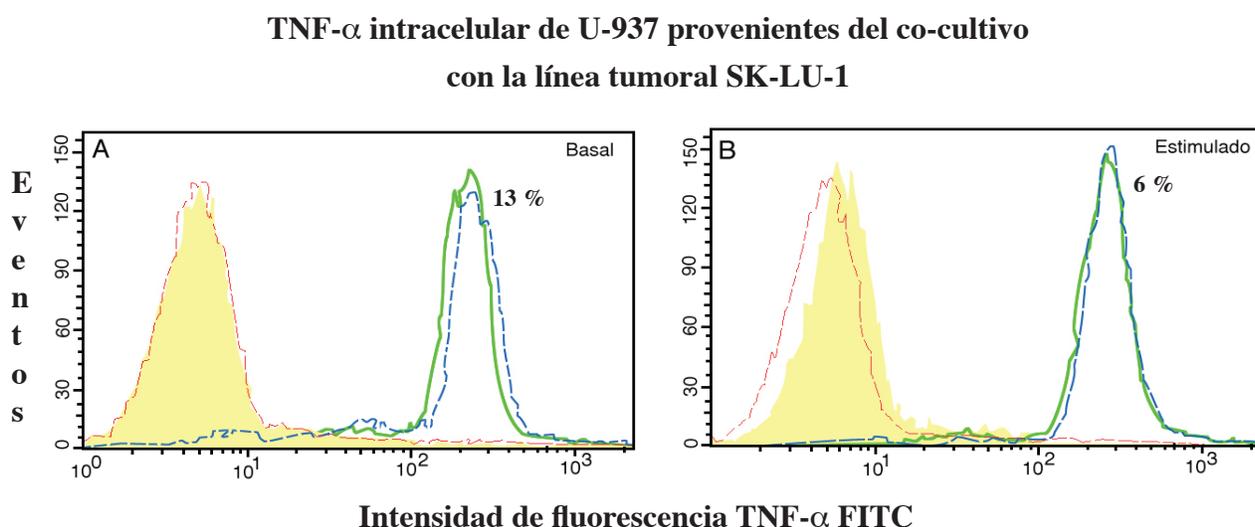


Figura 12. Citometría de flujo. Se muestra las dos condiciones estudiadas: la población monocítica no estimulada o basal (A) y la población monocítica estimulada (B). La autofluorescencia causada por la población U-937 control se representa por el área amarilla y la autofluorescencia de las células U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral SK-LU-1 se representa con una línea discontinua roja. La fluorescencia debida al TNF- α intracelular de la población U-937 control se representa por la línea verde y la fluorescencia debida al TNF- α intracelular de la población U-937 en co-cultivo con SK-LU-1 se representa por la línea discontinua azul.

Por otro lado, se observó el efecto de estimulación mediante PMA en la población U-937 control, en este ensayo la población monocítica U-937 control presentó una IMF de 218 y después de ser estimulada con PMA su IMF fue de 263 mostrando un incremento del 21%.

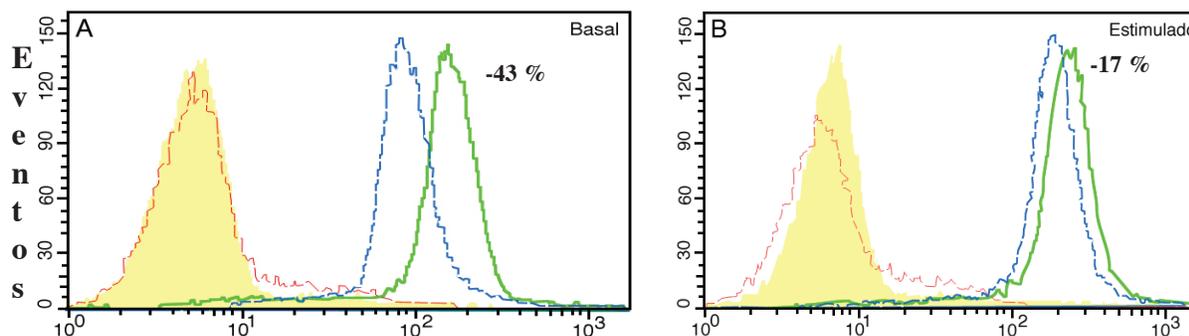
4) Efecto de la línea tumoral 3B1A

La población monocítica U-937 co-cultivada con la línea tumoral 3B1A mostró una marcada disminución en su IMF de 86 en comparación con la IMF obtenida por la población U-937 control (IMF=151), ver Figura 13A.

De manera similar, la población monocítica U-937 co-cultivada con la línea tumoral 3B1A y estimulada mostró una ligera disminución en su IMF. Esta población U-937 co-cultivada presentó una IMF de 178 menor a la IMF obtenida por la población U-937 control (IMF=214), bajo las mismas condiciones de estimulación, mostrando una diferencia porcentual del -17 % (ver Figura 13B).

En la Figura 13 se muestran los resultados de un experimento representativo de 2 ensayos realizados de manera independiente (n=2).

TNF- α intracelular de U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral 3B1A



Intensidad de fluorescencia TNF- α FITC

Figura 13. Citometría de flujo. Se muestra las dos condiciones estudiadas: la población monocítica no estimulada o basal (A) y la población monocítica estimulada (B). La autofluorescencia causada por la población U-937 control se representa por el área amarilla y la autofluorescencia de las células U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral 3B1A se representa con una línea discontinua roja. La fluorescencia debida al TNF- α intracelular de la población U-937 control se representa por la línea verde y la fluorescencia debida al TNF- α intracelular de la población U-937 en co-cultivo con 3B1A se representa por la línea discontinua azul.

Por otro lado, se observó el efecto de estimulación mediante PMA en la población U-937 control, en este ensayo la población monocítica U-937 control presentó una IMF de 151 y después de ser estimulada con PMA su IMF fue de 214 mostrando un incremento del 42%.

8.2.3 DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA TNF- α DE MEMBRANA EN MONOCITOS U-937

Efecto de las líneas tumorales en la expresión de la proteína TNF- α de membrana.

Las cuatro líneas tumorales estudiadas, tanto el tipo carcinoma epidermoide (SK-MES-1 y CALU-1) y el tipo adenocarcinoma (SK-LU-1 y 3B1A) mostraron comportamientos similares. La población monocítica U-937 posterior al co-cultivo con cada línea tumoral no mostró cambio en las IMF's con respecto a las IMF's de la población U-937 control; lo anterior fue observado en ambas condiciones experimentales, basal y estimulada con PMA.

A continuación se presenta dos ensayos representativos del efecto presentado por las 4 líneas tumorales de la expresión del TNF- α de membrana. Se muestra el efecto de las líneas tumorales SK-MES-1 y 3B1A.

A) Efecto de la línea tumoral SK-MES-1

La población U-937 no estimulada (basal) co-cultivada con la línea tumoral SK-MES-1 (carcinoma epidermoide) presentó una IMF de 68 muy semejante a la IMF obtenida de la población U-937 control (IMF=64), mostrando una diferencia porcentual[†] del 6.2% entre las IMF's comparadas (ver Figura 14A). De manera similar, la población monocítica U-937 estimulada con PMA proveniente del co-cultivo con SK-MES-1 mostró una IMF de 91 similar a la IMF de 90 de la población monocítica U-937 control (ver Figura 14B), mostrando una diferencia porcentual del 2%.

Como control interno del estímulo celular, se observó el efecto de estimulación mediante PMA en la población U-937 control, en este ensayo la población monocítica U-937 control presentó una IMF de 64 y después de ser estimulada con PMA su IMF fue de 90 mostrando un incremento del 41%.

[†] La diferencia porcentual (%) fue obtenida por la fórmula:

$$\% = \left[\frac{\text{IMF co-cultivo} - \text{IMF control}}{\text{IMF control}} \right] \times 100$$

En la Figura 14 se muestran los resultados de un experimento representativo de 3 experimentos realizados (n=3).

TNF- α de membrana de U-937 provenientes del co-cultivo

con la línea tumoral SK-MES-1

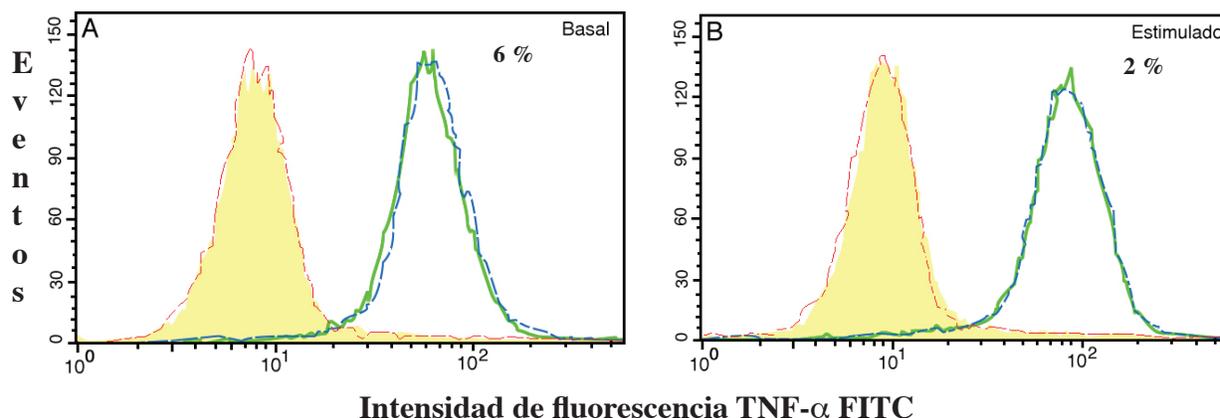


Figura 14. Citometría de flujo. Se muestra las dos condiciones estudiadas: la población monocítica no estimulada o basal (A) y la población monocítica estimulada (B). La autofluorescencia causada por la población U-937 control se representa por el área amarilla y la autofluorescencia de las células U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral SK-MES-1 se representa con una línea discontinua roja. La fluorescencia debida al TNF- α de membrana de la población U-937 control se representa por la línea verde y la fluorescencia debida al TNF- α de membrana de la población U-937 en co-cultivo con SK-MES-1 se representa por la línea discontinua azul.

B) Efecto de la línea tumoral 3B1A

En el estado basal, la población monocítica U-937 procedente del co-cultivo con la línea tumoral 3B1A (adenocarcinoma) presentó una IMF de 59 similar a la IMF obtenida por la población control U-937 (IMF=52) no estimulada. Mostrando un diferencia porcentual del 13% entre las intensidades medias de cada población estudiada (ver Figura 15A).

En estado estimulado, la población monocítica U-937, posterior al co-cultivo con 3B1A, mostró una IMF de 64 similar a la IMF de 69 de la población monocítica U-937 control (ver Figura15B), mostrando una diferencia porcentual del -7.3%.

En la siguiente Figura 15 se muestran los resultados de un experimento representativo e independiente de dos experimento realizados (n =2)

TNF- α de membrana de U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral 3B1A

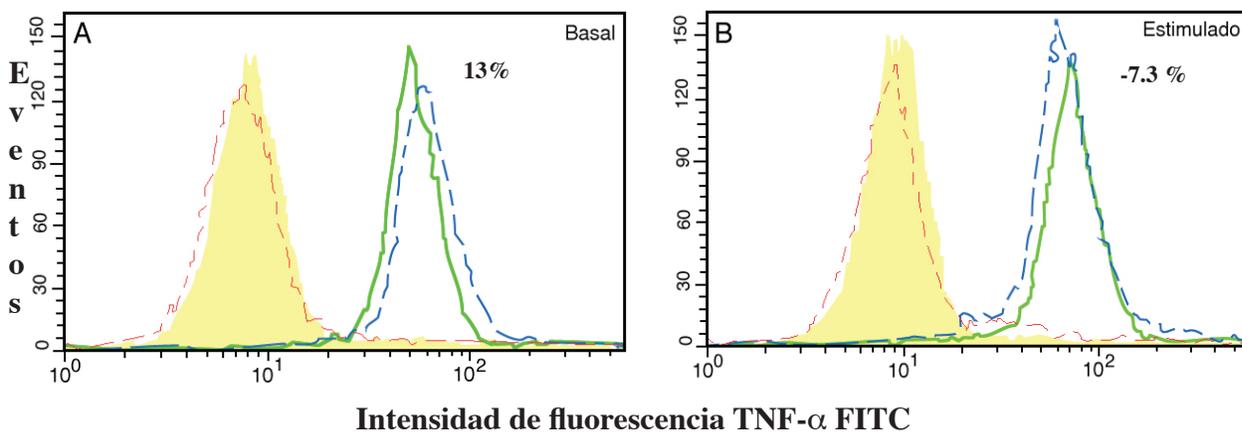


Figura 15. Citometría de flujo. Se muestra las dos condiciones estudiadas: la población monocítica no estimulada o basal (A) y la población monocítica estimulada (B). La autofluorescencia causada por la población U-937 control se representa por el área amarilla y la autofluorescencia de las células U-937 provenientes del co-cultivo con la línea tumoral 3B1A-1 se representa con una línea discontinua roja. La fluorescencia debida al TNF- α de membrana de la población U-937 control se representa por la línea verde y la fluorescencia debida al TNF- α de membrana de la población U-937 en co-cultivo con 3B1A-1 se representa por la línea discontinua azul.

Por otro lado, como control interno del estímulo celular, se observó el efecto de estimulación mediante PMA en la población U-937 control, en este ensayo la población monocítica U-937 control presentó una IMF de 52 y después de ser estimulada con PMA su IMF fue de 69 mostrando un incremento del 35%.

9. DISCUSIÓN

Avances en el conocimiento y el desarrollo de nuevas metodologías en el campo de la inmunología han permitido estudiar *in vitro* las diferentes células inmunocompetentes involucradas en el reconocimiento y en la eliminación del tumor; de esta manera, se ha profundizado en la comprensión de los distintos mecanismos de evasión presentados por los diferentes tipos de cánceres frente a la respuesta inmune antitumoral.

Un destacado constituyente del tumor sólido está representado por las células no tumorales, incluyendo células estromales (fibroblastos y células endoteliales) y leucocitos, y de éstos, los macrófagos son el componente mayoritario. Estos macrófagos infiltrantes del tumor (TIM's) han sido estudiados extensamente por su relación con las células tumorales y por sus funciones multifacéticas en el microambiente del tumor^{84, 88, 100, 101}.

El papel funcional de los TIM's como anti o pro-tumoral aún es debatido. Algunos inmunólogos han considerado a la presencia de los TIM's como evidencia de una respuesta inmunológica del huésped en contra del crecimiento tumoral. Varios estudios han demostrado el potencial citotóxico que poseen los macrófagos para eliminar tumores *in vitro*, cuando éstos son estimulados apropiadamente^{90,101-103}. En contraste, en los últimos años se ha incrementado evidencia experimental y clínica de la actividad pro-tumoral de los TIM's por su intervención en los procesos de progresión¹⁰⁴, invasión y metástasis del tumor¹⁰⁵.

Con respecto al cáncer pulmonar, particularmente en los tipos histológicos adenocarcinoma y carcinoma epidermoide del NSCLC, se ha caracterizado la población celular inflamatoria infiltrante del tumor mediante inmunohistoquímica. Esta población de células inflamatorias está constituida mayoritariamente por linfocitos y TIM's⁸⁹. Con relación al análisis funcional de los TIM's se ha reportado una baja producción de citocinas citotóxicas, como el TNF- α , la cual posiblemente está relacionada con la baja actividad citotóxica reportada⁸⁹. Por lo que, en el contexto del cáncer pulmonar, se puede considerar que en el microambiente del tumor se estarían generando las condiciones necesarias para inducir alteraciones en la expresión del TNF- α de los TIM's como un mecanismo de evasión tumoral.

Previos estudios *in vitro* demuestran que la disminución de la producción y liberación del TNF- α en los monocitos-macrófagos puede ser inducida, tanto por las interacciones membrana-membrana entre las células tumorales y los monocitos-macrófagos^{95,106}, así como por la liberación de moléculas solubles inmunosupresoras provenientes de las células tumorales y/o de los monocitos-macrófagos⁹⁵.

En nuestro estudio, a través de un modelo biológico *in vitro*, empleando co-cultivos celulares que permitieron un contacto directo entre los monocitos U-937 y las células tumorales, se determinó a qué nivel celular se presentan las alteraciones de la expresión del TNF- α en los monocitos (nivel transcripcional, traduccional y/o postraduccional).

Se observaron dos diferentes comportamientos biológicos, dependientes de la línea tumoral empleada: por un lado 1) la presencia de las líneas tumorales SK-LU-1 y CALU no indujeron cambios sobre la expresión del TNF- α de monocitos U-937; y por el otro 2) las líneas tumorales SK-MES-1 y 3B1A indujeron una disminución en la expresión del TNF- α de los monocitos U-937 .

1. No hay variación en la expresión del TNF- α

Con respecto al primer comportamiento, dos líneas tumorales (SK-LU-1 y CALU-1) de las cuatro estudiadas no indujeron cambios en la expresión del TNF- α de los monocitos U-937 en comparación con la expresión del TNF- α de los monocitos U-937 control. La ausencia de alteraciones en la expresión del TNF- α se observó en los niveles estudiados: a nivel transcripcional (RNAm), a nivel traduccional (proteína intracelular pro-TNF- α) y a nivel postraduccional (TNF- α de membrana).

En este sentido, el hecho de que algunas líneas celulares de carcinoma pulmonar no induzcan alteraciones en la expresión del TNF- α de los monocitos, sugiere que las células tumorales pueden montar diversos mecanismos de evasión en contra de la respuesta inmune antitumoral. Esto es, partiendo del fundamento teórico de que el sistema inmune innato es capaz de reconocer y eliminar a las células transformadas^{23, 24}.

Es importante señalar que, para inducir la activación de la expresión y liberación del TNF- α bioactivo por parte de los macrófagos, en respuesta a la presencia de células transformadas es necesario un contacto directo entre ambas células¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Se ha reportado que los ligandos de los receptores A y B “scavenger” (fucoidano, ácido poliguanílico), de los receptores de manosa (mannan) y del receptor CD44 (hialurano o HA), anclados a membrana de las células transformadas, inducen la expresión y liberación del TNF- α por parte de los monocitos/ macrófagos¹⁰⁶.

Con base en nuestros resultados, las líneas celulares de carcinoma pulmonar: SKLU-1 y CALU podrían carecer de antígenos o epítopes inmunoestimulantes y pasar desapercibidas por los monocitos/ macrófagos conduciendo a una falta o ausencia de alteraciones en la expresión del TNF- α .

2. Efecto inhibitorio en la expresión del TNF- α

Con respecto al segundo comportamiento, las líneas tumorales 3B1A y SK-MES-1 indujeron una disminución en la expresión del TNF- α de los monocitos U-937.

Dicha disminución ocurrió a nivel transcripcional (RNAm), observada en ambas condiciones basal y estimulada (ver resultados: Figuras 6 y 9). La disminución en los niveles del RNAm para el TNF- α se ve reflejada en los niveles de la proteína intracelular pro-TNF- α (ver resultados: Figura 10 y 13). Sin embargo, los niveles de la proteína del TNF- α de membrana permanecieron sin cambios (Figuras 14 y 15).

El TNF- α de membrana está expuesto a sufrir varios procesos celulares: por un lado puede ser escindido y liberado al microambiente a través de la metaloproteasa TACE⁴⁸, y por otro lado puede ser embebido hacia el interior de la célula para su reciclaje; en ambos procesos se estaría induciendo la promoción del transporte de la pro-proteína TNF- α del citosol hacia la superficie celular, lo cual coadyuvaría a la disminución de los niveles de la proteína intracelular. La no alteración en los niveles de la proteína del TNF- α de membrana observada, puede ser explicada, tal vez, porque la velocidad de recambio del TNF- α fue alterada; además, las células U-937 al presentar una reserva (pool) de TNF- α intracelular le permite tener un reciclaje del TNF- α sin alterar los niveles de éste sobre la membrana. Posiblemente un estudio a tiempos del co-cultivo más prolongados permitiría observar una disminución del TNF- α de membrana.

Estos resultados concuerdan con reportes previos^{90, 95, 97}, en los cuales se demuestra que el contacto entre los monocitos y las líneas celulares de diversos tipos de cánceres induce una disminución en la expresión del RNAm para el TNF- α y su liberación al microambiente⁹⁰. Y con respecto al cáncer pulmonar, se ha reportado que las líneas de carcinoma pulmonar de los tipo histológicos adenocarcinoma y carcinoma epidermoide, A-427 y SK-MES-1 respectivamente, inducen una disminución en la producción del TNF- α por los monocitos⁹⁵. Asimismo, estudios de nuestro grupo de investigación, empleando dos líneas celulares del tipo adenocarcinoma (A-427 y 1.3.11), también demuestran que estas líneas inducen la disminución en la secreción del TNF- α por los monocitos debido a una reducción en la expresión del transcrito para el TNF- α .

Estos resultados pudieran sugerir que las líneas de carcinoma pulmonar: A-427, SK-MES-1, 3B1A y 1.3.11 expresan antígenos inmunoestimuladores en su superficie celular que inducen la producción del TNF- α por los monocitos; y que, para evadir la acción citotóxica de esta citocina establecen diversos mecanismos de evasión como la inducción de la síntesis y liberación de moléculas inmunosupresoras que bloquean la expresión del TNF- α ; lo anterior se basa en reportes previos donde, la adición de proteínas membranales de algunas de estas líneas tumorales estimulan la producción del TNF- α por los monocitos¹⁰⁷.

Munker y colaboradores demuestran que la línea celular SK-MES-1 (carcinoma pulmonar) presenta receptores de membrana para el TNF- α ¹⁰⁹; y por tanto, sensibilidad a la acción citotóxica del TNF recombinante, *in vitro*⁹⁵.

En otro aspecto, diversos reportes han documentado que las células tumorales liberan factores inmunosupresores como la PGE₂, la IL-10, el TGF- β , GR, entre otros, los cuales regulan la expresión del TNF- α ⁸⁸. Se ha reportado que las líneas A-427, SK-MES-1 y SK-LU-1 expresan tanto el RNAm que codifica al TGF- β como a la proteína; pero no así para la IL-10¹¹⁰.

En este sentido, es conocido que el gen codificante para el TNF- α se encuentra regulado a distintos niveles celulares⁶⁴⁻⁷³. A nivel transcripcional y postranscripcional, se conoce que la expresión génica para TNF- α está regulada por la inhibición de los factores transcripcionales inducibles (AP-1, NF- κ B, c-JUN) requeridos para la formación del complejo transcripcional^{66, 67}, cuya formación inicia e intensifica la transcripción génica; o bien a través de la inducción de proteínas desacetiladoras las cuales inducen la represión transcripcional mediante la condensación de la cromatina⁶⁵. O por la desestabilización del RNAm mediante la inducción de proteínas desestabilizadoras como tristetrapoilina⁷⁰⁻⁷³.

En NSCLC humano se encuentra sobre-expresada la enzima COX-2 involucrada en la producción de PGE₂^{81, 111}. Altos niveles de PGE₂ en el microambiente del tumor inhiben la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α ⁸¹. Algunos estudios sugieren que la PGE₂ incrementa la transcripción y la producción de la proteína IL-10 en linfocitos de sangre periférica¹¹². La producción de IL-10 en el sitio del tumor altera la función y activación de las células T y APC por la inhibición de la señalización co-estimuladora del macrófago hacia la célula T; además suprime la inmunidad antitumoral mediada por células a través de la inhibición de la actividad citotóxica de los monocitos y TIM's; finalmente es un potente inhibidor de la expresión de moléculas inflamatorias como el TNF- α ^{76, 88}. En macrófagos estimulados con LPS, IL-10 inhibe parcialmente la síntesis de TNF- α mediante la promoción de la degradación de los RNAm's estabilizados por los sitios ARE de la región UTR3' del gen para TNF- α ⁷⁶.

Otra molécula liberada por diversos tipos de cánceres, incluyendo al cáncer pulmonar, es el TGF- β ⁷⁸⁻⁷⁹. Esta molécula regula la transcripción génica a través de la activación de proteínas denominadas Smad's, las cuales interaccionan directamente con el DNA, con factores de transcripción y con proteínas co-represoras de la transcripción que reclutan a desacetilasas de histonas. El TGF- β puede inducir la represión de la expresión del TNF- α a través de alguno de los mecanismos antes señalados.

En cuanto a receptores o moléculas involucrados en la señalización inhibitoria de la citotoxicidad mediada por el TNF- α de los monocitos, se ha reportado que diversos tumores liberan ligandos o moléculas que se unen a receptores o moléculas de adhesión sobre la superficie de los monocitos, como CD58, CD44, CD45 y receptores de quimiocinas del tipo CC o CXC, que inducen la activación de transducción de señales intracelulares que conllevan a la inhibición de la expresión del TNF- α ^{90,99}.

Entre los receptores, expresados en monocitos-macrófagos, más estudiados se encuentra el receptor CD44, cuyo ligando es el hialurano (HA) expresado en la matriz extracelular. Sin embargo, diversas células tumorales producen y liberan grandes cantidades de HA, esta sobre-expresión del HA en tumores se encuentra asociada directamente con el potencial de migración y metástasis⁹⁹. Existen reportes contradictorios acerca del papel funcional del HA, algunos reportan la actividad promotora del desarrollo e invasión del tumor⁹⁹; mientras otros, lo relacionan con la activación citotóxica mediada por citocinas como TNF- α , ROI y NO⁹⁰. Muchas de estas variaciones se deben a diferencias en la metodología utilizada; esto es, factores como: la concentración, el tamaño de la molécula, y la forma de ésta: soluble o anclada a membrana determinan su actividad funcional. Se ha observado *in vitro* que, altas concentraciones de HA de alto peso molecular son usualmente inhibitorios de la proliferación tumoral, mientras que bajas concentraciones de HA de bajo peso molecular pueden ser neutral o estimulador de la proliferación tumoral^{113, 114}.

Algunos estudios han demostrado que las interacciones moleculares entre el HA, anclado a membrana de las células tumorales, con su receptor de membrana CD44, en la superficie de los monocitos CD14⁺, inducen la activación de algunas vías de señalización intracelular que promueven la actividad citotóxica de los monocitos mediada por TNF- α , ROI y NO. En cambio, si la interacción del receptor CD44 se da con la forma soluble del HA de bajo peso molecular, se bloquea a los receptores CD44 de los monocitos y se inhibe su actividad citotóxica^{90, 99}.

En resumen, en el microambiente del tumor continuamente se están liberando diversas moléculas con actividad inmunosupresora como el HA de bajo peso molecular, IL-1 β , PGE₂, IL-10, TGF- β , entre otras, las cuales pueden ser las responsables de inducir la disminución del TNF- α a nivel de la transcripción del RNAm y verse reflejada en la producción intracelular de la proteína estudiada.

En conclusión, nuestros resultados indican que las líneas de carcinoma pulmonar pueden pasar desapercibidas y no estimular la producción del TNF- α por los monocitos U-937; o bien, inhiben la expresión del TNF- α en los monocitos U-937 como un mecanismo de evasión ante la respuesta inmune citotóxica antitumoral. En el último caso, la inhibición puede ser generada por las interacciones membrana-membrana entre las líneas tumorales y las células monocíticas; o bien por la liberación de algunos factores solubles, como el HA soluble, PGE₂, TGF- β , IL-10, GR, entre otros.

Con base en los resultados obtenidos, no se puede generalizar un comportamiento biológico común como mecanismo de evasión, presentado por un tipo histológico determinado, ya que en un mismo tipo histológico encontramos comportamientos distintos. Esta variabilidad en la respuesta celular puede ser explicada por la heterogeneidad biológica que presenta cada línea tumoral.

CONSIDERACIONES A FUTURO

Por la naturaleza pleiotrópica del TNF- α , el cual estimula múltiples y complejas vías de señalización intracelular interconectadas⁵²⁻⁵⁸ (MAPK, JNK, p38, NF- κ B, proteasas, ceramidas), hace difícil discernir sobre su papel biológico ante el desarrollo tumoral. De ahí que las acciones pro y anti-tumoral del TNF- α aún sean discutidas¹¹⁵⁻¹¹⁷.

En este sentido, es posible plantear a futuro un estudio que nos permita valorar el papel biológico-funcional de la disminución en la expresión del TNF- α por los monocitos, inducida por las distintas líneas tumorales. Esta disminución puede al menos tener dos interpretaciones: (1) como un mecanismo de evasión presentado por las células tumorales para evitar la muerte celular mediada por el TNF- α liberado por los monocitos/macrófagos; y (2) como un mecanismo por el cual las células tumorales generan un microambiente de inflamación crónica a través de la liberación de bajas concentraciones del TNF- α , dicha condición es necesaria para favorecer la síntesis de moléculas involucradas en los procesos de angiogénesis, desarrollo/ progresión y metástasis del tumor.

10. CONCLUSIONES

1. El modelo celular tipo monocito/macrófago U-937 permitió evaluar las alteraciones en la expresión del RNAm y en los niveles de la pro-proteína del TNF- α intracelular, causadas por las interacciones celulares en los co-cultivos con las líneas tumorales de carcinoma pulmonar de los tipos histológicos adenocarcinoma y carcinoma epidermoide.
2. Las líneas tumorales SK-LU-1 y CALU-1 no provocaron alteraciones en la expresión del TNF- α a ningún nivel celular (RNAm, pro-proteína intracelular, proteína asociada membrana) en los monocitos U-937.
3. El 50% de las líneas tumorales estudiadas disminuyen la expresión del TNF- α en los monocitos U-937, probablemente a través de las interacciones membrana-membrana y/o por la liberación de factores solubles inmunosupresores.
4. Las líneas tumorales 3B1A y SK-MES-1 inducen una inhibición en la expresión del RNAm para TNF- α , dicha disminución se ve reflejada en los niveles de la pro-proteína de TNF- α intracelular; pero no afecta los niveles de la proteína TNF- α anclada en la membrana de los monocitos U-937.
5. El efecto inhibitorio de la producción del TNF- α , a nivel del RNAm y pro-proteína intracelular, en células tipo monocito U-937 causado por las células tumorales, pudiera ser un mecanismo de evasión presentado por el tumor en contra de la respuesta inmune antitumoral.
6. No se puede generalizar un comportamiento biológico como mecanismo de evasión propio de cada tipo histológico determinado, ya que en un mismo tipo histológico se presentan comportamientos distintos.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Travis, W., Travis, L., Devesa, S. (1995) Lung Cancer. *Cancer* **75**, 191-202.
2. Richardson, G., Johnson, B. (1993) The biology of lung cancer. *Semin. Oncol.* **20**, 105-127.
3. Weinberg, R. (1996) How Cancer Arises. *Sci. Am.* **275**, 62-69.
4. Baret, J. (1993) Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect* **100**, 9-20.
5. Davila, D., Williams, D. (1993) The etiology of lung cancer. *Mayo. Clin. Proc.* **68**, 170-182.
6. Pitot, H., Dragan, Y. (1991) Facts and theories concerning the mechanisms for carcinogenesis. *FASEB. J.* **5**, 2280-2286.
7. Ruoslahti, E. (1996) How Cancer Spreads. *Sci. Am.* **275**, 72-77.
8. Zöchbauer-Müller, S., Gazdar, A. and Minna, J. (2002) Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 681-708.
9. Lazcano, P., Tovar, G., Meneses, G., Rascon, P., y Hernández, A. (1997) Trends of lung cancer mortality in México. *Arch. Med. Res.* **28**, 565-570.
10. Medina-Morales, F., Salazar-Flores, M. (2000) Frecuencia y patrón cambiante del cáncer pulmonar en México. *Salud pública Mex.* **42**, 333-336.
11. Williams, C. (1993) Diet and cancer prevention. *Chem. Ind.* **19**, 280-283.
12. Trichopoulos, D., Frederick, P., Hunter, D. (1996) What causes cancer? *Sci. Am.* **275**, 80-87.
13. Gazdar, A., Minna, J. (1997) Cigarettes, sex, and lung adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 1563-1563.
14. Merlo, A., Herman, J., Mao, L., Lee, D., Gabrielson, E., et al. (1995) 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour supresor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat. Med.* **1**, 686-692.
15. Baylin, S., Herman, J., Graff, J., Vertino, P., Issa, J. (1998). Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* **72**, 141-196.
16. Kim, D. (2001) p16 (INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **61**(8), 3419-3424.
17. Momparler, R., Eliopoulos, N., Ayoub, J. (2000) Evaluation of an inhibitor of DNA methylation, 5-aza-2'-deoxycitidina, for treatment of lung cancer and the future role of gene therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **465**, 433-446.

18. Sekido, Y., Fong, K., Minna, J. (1998) Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochem. Biophys. Acta* **1378**, F21-59.
19. Hiyama, K., Hiyama, E., Ishioka, S., Yamakido, M., Inai, K., et al. (1995) Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 895-902.
20. Albanell, J., Lonardo, F., Rusch, V., Engelhardt, M., Langenfeld, J., et al. (1997) High telomerase activity in primary lung cancers: association, cellular immortalization and cancer. *Ann. Med.* **33**, 123-129.
21. Yesner, R. (1993) Pathogenesis and pathology. *Clin. Chest. Med.* **14**, 17-30.
22. Beasley, M., Brambilla, E. and Travis W. (2005) The 2004 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Semin Roentgenol.* **40**(2):90-7.
23. Smyth, M., Godfrey D. and Trapani, J. (2001) A fresh look at tumor immunosurveillance and immunoterapia. *Nat. Immunol.* **2**, 293-299.
24. Lanier, L. A renaissance for the tumor immunosurveillance hypothesis. (2001) *Nat. Med.* **7**, 1178-1180.
25. Burnet, F. (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* **13**, 1-27.
26. Matzinger, P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991-1045.
27. Kärre, K. (2002) NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol.* **55**, 221-228.
28. Bauer, S., Groh, V., Wu, J., et al. (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**, 727-729.
29. Mantovani, A., Botazzi, B., Colotta, F., et al. (1992) The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today* **14**(2):120-123.
30. Carswell, E., Old, L., Kassel R., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3666-3670.
31. Vassalli, P. (1992) The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Ann. Rev. Immunol.* **10**, 411-452.
32. Tracey, K., Beutler, B., Lowry, S., et al. (1986) Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* **234**, 470-474.
33. Bleutler, B., Cerami, A. (1988) Tumor necrosis, caquexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 505-517.

34. Tracey, K. and Cerami, A. (1994) Tumor Necrosis Factor: A pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Ann. Rev. Med.* **45**, 491-503.
35. Henter, J., Söder, O. and Andersson, U. (1988) Identification of individual tumor necrosis factor/cachectin-producing cells after lipopolysaccharide induction. *Eur. J. Immunol.* **18**, 983-988.
36. Gifford, G., Flick, D., Abadllah, N. and Fisch, H. (1984) Production of a cytotoxin from phorbol myristate acetate-treated human promyelocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* **73**, 69-73.
37. Goldfeld, A., Tsai, E., Kincaid, R., Belshaw, P., Schrieber, S., Strominger, J. and Roa, A. (1994) Calcineurin mediates human tumor necrosis factor alpha gene induction in stimulated T and B cells. *J. Exp. Med.* **180**(2):763-768.
38. Bogdan, C. and Ding, A. (1992) Taxol, a microtubule-stabilizing antineoplastic agent, induced expression of tumour necrosis factor α and interleukin-1 in macrophages. *J. Leuk. Biol.* **52**, 119-121.
39. Aderka, D., Holtmann, H., Toker, L. and Wallach, D. (1986) Tumour necrosis factor induction by Sendai virus. *J. Immunol.* **136**, 2938-2942.
40. Sprecher, E. and Becker, Y. (1992) Detection of IL-1 β , TNF- α and IL-6 gene transcription by the polymerase chain reaction in keratinocytes, langerhans cells and peritoneal exudates cells during infection with herpes simplex virus-1. *Arch. Virol.* **126**(1-4), 253-269.
41. Blasi, E., Pitzurra, L., Puliti, M., Bartoli, A. and Bistoni, F. (1992) *Candida albicans* hyphal form enhances tumour necrosis factor mRNA levels and protein secretion in murine ANA-1 macrophages. *Cell. Immunol.* **142**, 137-144.
42. Fiers, W. (1991) Tumor necrosis factor: characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett.* **285**, 199-215.
43. Wang, A., Creasey, A., Ladner, M., Lin, L., Strickler, J., Van Arsdell, J., Yamamoto, R. and Mark, D. (1985) Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* **228**, 149-154.
44. Pennica, D., Nedwin, G., Hayflick, J., Seeburg, P., Derynck, R., Palladino, M., Kohr, W., Aggarwal, B. and Goeddel, D. (1984) Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**, 724-728.
45. Marmenout, A., Fransen, L., Tavernier, J., Van Der Heyden, J., Tizard, R., Kawashima, E., Shaw, A., Johnson, M., Simon, D., Muller, R., Ruysschaert, M., Van Vliet, A., Y Fiers, W. (1985) Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. *Eur. J. Biochem.* **152**, 515-522.
46. Shirai, T., Yamaguchi, H., Ito, H., Todd, C. and Wallace, R. (1985) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumor necrosis factor. *Nature (UK)* **313**, 803-806.

47. Davis, J., Marachi, M., Alton N. and Arakawa, T. (1987) Structure of human tumor necrosis factor α derived from recombinant DNA. *Biochemistry* **26**, 1322-1326.
48. Black, R., Charles, T., Kozlosky, C., Peschon, J., Slack, J., Wolfson, M., Castner, B., Kim, L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiaini, N., Schooley, K., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J., Johnson, R., Paxton, R., March, C., Cerretti, D. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729-733.
49. Moss, M., Jin, S., Milla, M., et al. (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* **385**, 733-736.
50. Smith, R. and Baglioni, C. (1986) The active form of tumor Necrosis Factor is a Trimer. *J. Biol. Chem.* **262**, 6951-6954.
51. Gruss, H. and Dower, S. (1995) The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases. *Cytokines Mol. Ther.* **1**, 75-105.
52. Locksley, R., Killeen, N. and Lenardo, M. (2001). The TNF and TNF receptor Superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501.
53. MacEwan, D. (2002) TNF receptor subtype signalling: Differences and cellular consequences. *Cell. Signal.* **14**, 477-492.
54. Wallach, D., Warfolomeen, E., Malinin, N., Goltsev, Y., Kovalenko, A. and Boldin, M. (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 331-367.
55. Baud, V. and Karin, M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* **11**, 372-377.
56. Ventura, J., Olivia, E., Zentella, A. Caspasas: Una cascada de proteasas implicadas en la muerte celular por apoptosis. *BEB* **18**(4), 153-165.
57. Boldt, S. and Kolch, W. (2004) Targeting MAPK signalling: Prometheus' fire o pandora's box. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 1885-1905.
58. Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, Cr., Eberhard, D., et al. (2004) A physical and functional map of the human TNF- α /NF- κ B signal transduction pathway. *Nat. cell biol.* **6**, 97-105.
59. Spies, T., Morton, C., Nedospasov, S., Fiers, W., Pious, D. and Strominger, J. (1986) Genes for the tumor necrosis factors α and β are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 8699-8702.
60. Pope, R., Mungre, Sh., Liu, H. Thimmapaya, B. (2000) Regulation of TNF- α expression in normal macrophages: The role of C/EBP β . *Cytokine* **12**, 1171-1181.

61. Tsai, E., Falvo, J., Tsytsykova, A., Barczak, A., Reimold, A., Glimcher, L., Fenton, M., Gordon, D., Dunn, I. and Goldfeld A. (2000) A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6084-6094.
62. Leitman, D., Ribeiro, R., Mackow, E., Baxter, J. and West, B. (1991) Identification of a Tumor Necrosis Factor-responsive element in the Tumor Necrosis Factor α gene. *J. Biol. Chem.* **266**, 9343-9346.
63. Idriss, H., Naismith, J. (2000) TNF- α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.* **50**, 184-195.
64. Raabe, T., Bukrinsky, M., Currie, R. (1998) Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor-alpha by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **273**, 974-980.
65. Lee, J., Kim, N., Sandord, A. and Sullivan, K. (2003) Histone acetylation and chromatin conformation are regulated separately at the TNF- α promoter in monocytes and macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **73**, 862-871.
66. Falvo, J., Ugliarolo, A., Brinkman, B., Merika, M., Parekh, B., Tsai, E., King, H., Morielli, A., Peralta, E., Maniatis, T., Thanos, D. and Goldfeld, A. (2000) Stimulus-specific assembly of enhancer complexes on the tumor necrosis factor alpha gene promoter. *Mol. Cell Biol.* **20**, 2239-2247.
67. Barthel, R., Tsytskova A., Barczak, A., Tsai, E., Dascher, Ch, Brenner, M. and Goldfeld A. (2003) Regulation of Tumor Necrosis Factor Alpha gene expression by Mycobacteria involves the assembly of a unique enhanceosome dependent on the coactivator proteins CBP/p300. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 526-533.
68. Espel, E., Garcia-Sanz, J., Aubert, V., Menoud, V., Sperisen, P., Fernandez, N. and Spertini, F. (1996) Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor-alpha by lipopolysaccharide. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2417-2424.
69. Brook, M., Sully, G., Clark, A., Saklatval, J. (2000) Regulation of tumour necrosis factor α mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade. *FEBS Lett.* **483**, 57-61.
70. Paul, A. Post-transcriptional regulation of tumour necrosis factor α production. (2000) *Ann. Rheum. Dis.* **59** (suppl I):i3-i5.
71. Kracht, M. and Saklatvala, J. (2002) Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine* **20**, 91-106.
72. Leitman, D., Ribeiro, R., Mackow, E., Baxter, J. and West, B. (1991) Identification of a Tumor Necrosis Factor-responsive element in the Tumor Necrosis Factor α gene. *J. Biol. Chem.* **266**, 9343-9346.

73. Mahtani, K., Brook, M., Dean, J., Sully, G., Saklatvala, J. and Clark, A. (2001) Mitogen-Activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of Tristetraprolin, a regulator of Tumor Necrosis Factor alpha mRNA stability. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6461-6469.
74. Smoak, K., Cidlowski, J. (2004) Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech. Ageing Dev.* **125**, 697-706.
75. Pestka, S., Krause, Ch., Sarkar, D., Walter, M., Shi, Y. and Fisher, P. (2004) Interleukin-10 related cytokines and receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 929-979.
76. Haddad, J., Saadé, N. and Safieh-Garabedian, B. (2003) Interleukin-10 and the regulation of mitogen-activated protein kinases: are these signalling modules targets for the anti-inflammatory action of this cytokine? *Cell. Signal.* **15**, 255-267.
77. Schottelius, A., Mayo, M., Sartor, R. and Baldwin, A. (1999) Interleukin-10. Signaling blocks inhibitor of κ B kinase activity and nuclear factor κ B DNA binding. *J. Biol. Chem.* **274**, 31868-31874.
78. Lutz, M. and Knaus, P. (2002) Integration of the TGF- β pathway into the cellular signalling network. *Cell. Signal.* **14**, 977-988.
79. Dannler, S., Goumans, M. and Dijke, P. (2002) Transforming growth factor β signal transduction. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 731-740.
80. Murakami, M. and Kudo, I. (2004) Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E₂-biosynthetic pathway. *Prog. Lipid Res.* **43**, 3-35.
81. Brown, J. and DuBois, R. (2004) Cyclooxygenase as a target in lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4266s-4269s (suppl.)
82. Stolina, M., Sharma, Sh., Lin, Y., Dohadwala, M., Gardner, B., Luo, J., Kronenberg, M., Millar, P., Portanova J., Lee J. and Dubinett S. (2000) Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J. Immunol.* **164**, 361-370.
83. Leek, R., Lewis, C., Whitehouse, R., Greenall, M., Clarke, J. and Harris, A. (1996) Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* **56**, 4625-4629.
84. Alleva, D., Burger, C., Elgert, K. (1994) Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF- α production. Role of tumor-derived IL-10, TGF- β , and prostaglandin E₂. *J. Immunol.* **153**; 1674-1686.
85. Dinapoli, M., Calderon, C., López, D. (1996) The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduced expression of the inducible nitric oxide synthetase gene. *J. Exp. Med.* **183**, 1323-1329.

86. Crowther, M., Brown, N., Bishop E. and Lewis, C. (2001) Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 478-490.
87. Sunderkotter, C., Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardwah, R., Sorg, C. (1994) Macrophages and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **55**, 410-422.
88. Elgert, K., Alleva, D. and Mullins, D. (1998) Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J. Leukoc. Biol.* **64**, 275-290.
89. Katakai, A. Scheid, P., Piet, M., Marie, B., Martinet, N., Martinet Y. and Vignaud, J. (2002) Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression. *J. Lab. Clin. Med.* **140**, 320-328.
90. Mytar, B., Woloszyn, M., Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Siedlar, M., Ruggiero, I., Wieckiewicz J., Zembala, M. (2003) Tumor cell-induced deactivation of human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 1094-1101.
91. Browning, J. and Ribolini, A. (1989). Studies on the differing effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin on the growth of several human tumor lines. *J. Immunol.* **143**, 1859-1867.
92. Spriggs, D., Imamura, K, Rodriguez, C., Horiguchi, J. and Kufe, D. (1987) Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 6563-6566.
93. Gatanaga, T., Lentz, R., Masunaka, I., Tomich, J., Jeffes, E., Baird, M., Granger, G. (1990) Identification of TNF-LT blocking factors(s) in the serum and ultrafiltrates of human cancer patients. *Lymphokine Res.* **9**, 225-229.
94. Selinsky, C. and Howell, M. (2000). Soluble tumor necrosis factor receptor type I enhances tumor development and persistence in vivo. *Cell Immunol.* **200**, 81-87.
95. Sullivan, L., Hernandez, G. Ponce, N., Aguilar, C., Mandoki, J., Medina, M., Cervera, M., and Villalba, C. (2000) Evasion mechanisms to tumor necrosis factor a (TNF- α) of small cell lung carcinoma and non-small cell lung carcinoma cell lines: comparison with the erythroleukaemia K-562 cell line. *Lung Cancer* **27**, 177-187.
96. Corrin, B. (1989) Development and structure of the normal human lung. In- Turner-Warwick —M, Hudson M. E., Corrin B., Kerr I. H., Editors Respiratory Diseases. London: Grover Medical Publishing.
97. Sullivan, L., Avila, F., Aguilar, C. (2007) Lung carcinomas decrease the number of monocytes/macrophages that produce TNF- α . *Clin. Immunol.* **123** (en prensa).
98. Chomczynsky, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **1**,156-159.

99. Mytar, B., Siedlar, M., Woloszyn, M., Colizzi, V., Zembala, M. (2001) Cross-talk between human monocytes and cancer cells during reactive oxygen intermediates generation: the essential role of hyaluronan. *Int. J. Cancer*. **94**(5):727-32.
100. Chen, J., Lin, Y., Yao, P., Yuan, A., Chen, H., Shun. Ch., Tsai, M., Chen Ch. and Yang P. (2005) Tumor-Associated Macrophages: The Double-Edge Sword in Cancer Progresión. *J. Clin. Oncol.* **23**; 953-964.
101. Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., Allavena, P. (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumor progresión: Potencial targets of anti-cancer therapy. *Eur. J. Cancer* **42**; 717-727.
102. Gough, M., Melchor, A., Ahmed, A., Crittenden, M., Riddle, D., Linardakis, E., Ruchatz, A., Emiliusen, L. and Vile, R. (2001) Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death. *Cancer Res.* **61**; 7240-7247.
103. Weynants, P., Marchandise, F., Sibille, Y. (1997) Pulmonary perspective: immunology in diagnosis and treatment of lung cancer. *Eur. Respir. J.* **10**; 1703-1719.
104. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. (2004) Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progresión. *Eur. J. Cancer* **40**; 1660-1667.
105. Pollard, J. (2004) Tomour-educated macrophages promote tumour progresión and metastasis. *Nat. Rev.* **4**; 71-78.
106. Mytar, B., Woloszyn, M., Macura-Biegun, A., Hajto, B., Ruggiero, I., Piekarska, B., Zembala, M. (2004) Involvement of pattern recognition receptors in the induction of cytokines and reactive oxygen intermediates production by human monocytes/macrophages stimulated with tumour cells. *Anticancer Res.* **24**; 2287-2294.
107. DeMarco, R., Ensor, J., Hasday, J. (1991) Tumor-stimulated release of tumor necrosis factor- α by human monocyte-derived macrophages. *Cell. Immunol.* **140**; 304-318.
108. Zembala, M., Siedlar, M., Ruggiero, I., Wieckiewicz, J., Mytar, B., Mattei, M., Colizzi, V. (1994) The MHC class-II and CD44 molecules are involved in the induction of tumour necrosis factor (TNF) gene expression by human monocytes stimulated with tumour cells. *Int. J. Cancer.* **56**; 269-274.
109. Munker, M., Munker, R., Saxton, R., Koeffler, H. (1987) Effect of recombinant monokines, lymphokines, and other agents on clonal proliferation of human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* **47**; 4081-4085.
110. Huang, M., Wang, J., Lee, P., Sharma, Sh., Mao, J., Meissner, H., Uyemura, K., Modlin, R., Wollman, J., Dubinett, S. (1995) Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res.* **55**; 3847-3853.

111. Dohadwala, M., Batra, R., Luo, J., Krysan, K., Pold, M., Sharman, Sh., Dubinett, S. (2002) Autocrine/paracrine prostaglandin E₂ production by non-small cell lung cancer regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion. *J. Biol. Chem.* **277**; 50828-50833.
112. Huang, M., Sharma, Sh., Mao, J., Dubinett S. (1996) Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandin E₂ enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production. *J. Immunol.* **157**; 5512-5520.
113. Toole, B. (2002) Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology* **12**; 37R-42R.
114. Toole, B., Wight, T. and Tammi, M. (2002) Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *J. Biol. Chem.* **227**; 4593-4596.
115. Balkwill, F. (2002) Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine & Growth Factor Rev.* **13**; 135-141.
116. Lewis, C. and Pollard, J. (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* **66**; 605-612.
117. Mocellin, S., Rossi, C., Pilati, P., Nitti, D. (2005) Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine & Growth Factor Rev.* **16**; 35-53.
118. Guha, M., Mackman, N. (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* **13**; 85-94.
119. Boles, B., Ritzenthaler, J., Birkenmeier, T., Roman, J. (2000) Phorbol ester-induced U-937 differentiation: effects on integrin α_5 gene transcription. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **278**; L703-12.
120. Franklin, Ch., Sanchez, V., Wagner, F., Woodgett, J., Kraft, A. (1992) Phorbol ester-induced amino-terminal phosphorylation of human JUN but not JUNB regulates transcriptional activation. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**; 7247-7251.
121. Shirai, Y., Saito, N. (2002) Activation mechanisms of protein kinase C: Maturation, catalytic activation and targeting. *J. Biochem.* **132**; 663-668.
122. Kiley, S., Parker, P. (1995) Differential localization of protein kinase C isozymes in U-937 cells: evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation. *J. Cell. Sci.* **108**; 1003-1016.
123. Kontny, E., Ziolkowska, M., Ryzewska, A., Maslinski, W. (1999) Protein Kinase C-dependent pathway is critical for the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6). *Cytokine.* **11**; 839-848.

12. ANEXOS

12.1 ANEXO A

SEÑALIZACIÓN DEL TNF- α A TRAVÉS DE SUS RECEPTORES

La señalización del TNF- α es muy compleja. Brevemente, la unión del trímero de TNF- α al receptor TNFR1 induce su trimerización y el reclutamiento de algunas proteínas de señalización intracelular a los dominios DD del receptor. La primera proteína reclutada al TNFR1 es TRADD, la cual sirve como plataforma para reclutar a tres mediadores adicionales más pequeños: RIP-1 (receptor-interacting protein-1), FADD (Fas-associated death domain protein) y TRAF2 que posee alta afinidad por TRADD y tiene la capacidad de interactuar directamente con el TNFR2. FADD contiene un dominio efector de muerte (DED), el cual interactúa con el dominio DED de la caspasa 8 y forma el complejo de señalización de inducción de muerte del TNFR1 o DISC (Death-inducing signalling complex). Este complejo activa a una serie de moléculas diana: caspasas, lipasas y proteínas cinasas, que propagan la señalización intracelular⁵²⁻⁵⁵ (Figura 1 y 16).

Caspasas. Las caspasas (cistein-aspartato proteasas) son proteasas ácidas que tienen un residuo de cisteína en el sitio activo y que reconocen un residuo de ácido aspártico en el sitio de corte. Son un grupo de 14 diferentes formas de zimógenos, los cuales participan en la inducción apoptótica. Las caspasas 2, 8, 9 y 10 son conocidas como caspasas de iniciación de la apoptosis que se sitúan corriente arriba de las pro-caspasas ejecutoras 1, 3, 6 y 7, las cuales existen en una forma latente hasta ser activadas por su iniciador, a través de un proceso de escisión, oligomerización y autoactivación. Se conoce poco acerca de la función de las caspasas 4, 5, 12, 13 y 14. Las caspasas inician el “suicidio” celular por la destrucción controlada de sus propios mecanismos de reparación celular. La mitocondria, el centro de energía de las células, es sensible a las señales apoptóticas vía una familia de proteínas Bcl-2 que puede inhibir (Bcl-2, Bcl-x) o promover (Bax, Bad, Bak, Bik, Bid) a la apoptosis. La caspasa 8 rompe a Bid y produce una forma truncada (tBid) que se transloca del citosol hacia la mitocondria. Esta caspasa 8 mediante Bid es el paso de activación que permite reducir el potencial de membrana mitocondrial y la liberación del citocromo C, el cual se une a una proteína adaptadora Apaf-1, y una proteína de 130 kDa que contiene un dominio de reclutamiento de caspasa N-terminal que se une a la pro-caspasa 9 para formar el complejo llamado apoptosoma, y éste activa a las caspasas ejecutoras 3 y 7, entonces median la proteólisis apoptótica de proteínas claves en la reparación y gobierno celular, además de la activación de DNAsas activadas por las caspasas (CAD's) que destruyen el genoma permitiendo la característica fragmentación del DNA y el bandedo asociado con la muerte celular vía apoptótica⁵⁶.

Lipasas. TNFR1 activa a la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-LPC), a través de una porción definida del dominio intracelular del receptor. El TNFR1 activa a la PC-LPC, la cual degrada a la fosfatidilcolina a colina (molécula sin función en la señalización) y diacilglicerol activador fisiológico de muchas proteínas cinasas C (PKC). Así como, la estimulación de SMase, la cual existe en dos formas: ácida y neutra. Estas enzimas estimulan el rompimiento de los esfingolípidos de membrana a ceramidas, y éstas pueden ser convertidas a otros lípidos que contiene ceramidas como son la esfingosina y esfingosina-1-fosfato (S-1-P). La ceramida exógena es un químico altamente específico y, en muchos tipos celulares, estimula el proceso de muerte celular por apoptosis. Este proceso de señalización incluye una activación secuencial de Bad.

Por otro lado, los esfingolípidos estimulados por el TNF son también capaces de ser convertidos dentro de S-1-P, los cuales tienen acciones intracelulares que incluyen el incremento del calcio intracelular y la estimulación de MAPK.

Otra lipasa fuertemente estimulada por los receptores de TNF es la fosfolipasa A_2 dependiente de calcio citoplasmático (cPLA₂), ella es responsable de la liberación del ácido araquidónico (AA) a partir de fosfatidilcolina principalmente. El AA puede ser convertido en prostaglandinas y leucotrienos o estimular receptores sensoriales de eicosanoides. Estos eicosanoides son responsables de la generación de lípidos que contienen radicales libres de oxígeno y especies reactivas de oxígeno que rompen la integridad de la membrana mitocondrial y promueven la apoptosis⁵³⁻⁵⁵.

Cinasas y fosfatasa. Muchos mecanismos de señalización liberan mensajes de transducción desde fuera de la célula hacia su citosol y núcleo, basados en una fina regulación que involucran cascadas de fosforilación y desfosforilación de proteínas. La fosforilación a través de proteínas cinasas representa puntos críticos para la transmisión, amplificación y distribución de las señales.

El estado de fosforilación de los residuos tirosina, serina y treonina, son una de las principales señales reguladoras en el citoplasma de células eucariontes. Existen más de una docena de proteínas cinasas activadas por mitógenos y/o estrés, llamadas MAPK (del inglés: mitogen-activated protein kinase), que se agrupan en tres familias: (1) Cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), (2) p38 MAPK y (3) proteínas cinasas activadas por estrés/cinasa c-jun N-terminal (JNK/SAPK). Estas enzimas son caracterizadas por su proceso de activación por fosforilación dual sobre treonina y tirosina (Thr-X-Tyr, donde X puede ser Glu para los miembros de ERK, Gly para p38 MAPK, o Pro para la familia JNK de las cinasas de respuesta al estrés).

Las tres familias de MAPK han sido involucradas en la respuesta inmune y juegan un papel determinante en la regulación de la expresión de genes como el TNF- α en macrófagos. Todas las MAPK's están reguladas por una cascada de fosforilación de proteínas que se encuentran organizadas en un módulo central que consiste en tres cinasas. La configuración de este núcleo central comprende a MAPKKK o MAP3K (MAPK cinasa cinasa), la cual es típicamente una cinasa específica serina/treonina que fosforila y activa a MAPKK o MAP2K (MAPK cinasa). Ellas activan a MAPK por fosforilación del motivo T-X-Y en el sitio de activación. Las MAPK activadas pueden ser translocadas al núcleo y fosforilar a los factores transcripcionales. Esto constituye una conexión directa entre la señal extracelular y los cambios en la transcripción génica^{53,57}.

Señalización ERK.

Esta vía de señalización consiste en una cascada de tres cinasas que son activadas por las proteínas G pequeñas (Ras), la cual interactúa con MAPKKK (MEK-1/2) y entra al punto de la cascada, culminando en la activación de factores transcripcionales como: Elk-1, proteínas SAP (regulan la transcripción del gen c-fos) y las proteínas de la familia Ets (Ets1/2), éstos últimos interactúan con los factores transcripcionales AP-1 (AP-1 es el nombre colectivo para los factores transcripcionales que consisten en heterodímeros formados por Jun y Fos o homodímeros de Jun) y NF- κ B en la región promotora del gen. La vía ERK está involucrada en varios procesos celulares fundamentales como proliferación, diferenciación, apoptosis⁵⁷.

Señalización JNK/SAPK.

Los principales activadores de la vía JNK son estímulos de estrés y citocinas proinflamatorias que activan a MEKK (MKK1, MKK4 y MKK7) y a las tres isoformas de JNK que se unen y fosforila a los factores transcripcionales: ATF-2 (activating transcription factor-2), NFAT (nuclear factor of activated T-cells)⁵⁷.

Señalización p38.

Esta vía responde a señales de estrés físico como: calor, irradiación y sustancias químicas, las cuales son sensadas por las células. La principal función de las cinasas p38 parece ser la respuesta celular a estas señales de estrés. Dependiendo del tipo de estímulo y el contexto celular la vía p38 puede evitar o promover la muerte celular por apoptosis. Además induce y regula la expresión de citocinas proinflamatorias como el TNF- α . A través de la fosforilación y activación de factores transcripcionales como CREB/ATF-1, ATF-2 y ATF-6. ATF-2, puede heterodimerizarse con proteínas Jun y activar la transcripción en sitios AP-1⁵⁷.

Las familias JNK y ERK son altamente activas en los mecanismos de señalización del receptor de TNF. JNK es activada principalmente por MEK4, y MEK7. Ambos receptores TNFR1 y TNFR2 son capaces de activar a JNK^{53,57}.

Señalización mediada por NF-κB.

TRAF2 y RIP-1 son capaces de activar a la cinasa inductora de NF-κB o NIK, la cual es un miembro de la familia de proteínas cinasas serina/treonina activadas por mitógeno o MAPK. NIK fosforila a la enzima llamada inhibidor de κB (IκB) cinasa (IKK) en la serina 176, la cual está implicada en la activación del factor transcripcional NF-κB, involucrado en la respuesta transcripcional al estrés y en la acción celular anti-apoptótica. Uno de los genes diana del factor transcripcional NF-κB es la proteína celular inhibidora de la apoptosis-2 (c-IAP2) la cual se une a TRAF2 y es capaz de bloquear la activación de la caspasa 8 y la apoptosis^{53,57,58} (Figuras 16).

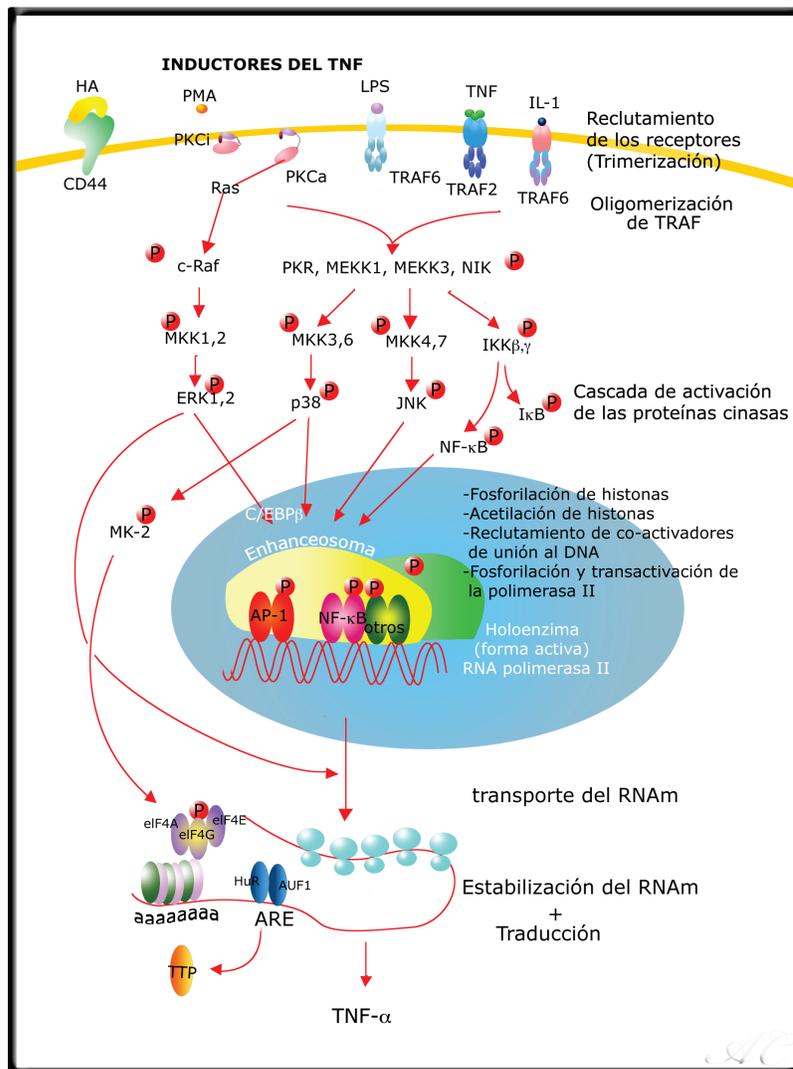


Figura 16. Representación esquemática de los mecanismos de señalización intracelular que regulan la expresión génica y proteica de citocinas pro-inflamatorias como TNF-α. *Cytokine* 20 (2002) 91-106.

12.2 ANEXO B

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN PARA TNF- α

El control de la expresión del TNF- α es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular, este control es efectuado mediante múltiples estrategias. EL TNF- α exhibe una complejidad en su regulación y se considera que está jerarquizada. La transcripción del TNF- α está regulada a través de la producción y/o activación de factores de transcripción^{61,62}; además de la formación del complejo transcripcional (enhanceosoma)^{70,71}. Otro punto de regulación se encuentra a nivel postraduccional, el mensajero del TNF- α en su región UTR 3' contiene secuencias reguladoras que consisten en adenosina-uracilo (A-U), formando pentanucleótidos AUUUA en múltiplos (estos sitios son referidos como elementos ricos en AU o ARE [AU-rich elements]), las cuales regulan la estabilidad del mensajero. Los sitios ARE de transcritos, (que codifican a citocinas, oncoproteínas, factores de crecimiento y de transcripción), han sido mapeados en su región UTR 3', muestran afinidad por varias moléculas como: Tristetraprolina^{63,71}, antígeno-1 intracelular de células T (TIA-1), y proteína relacionada a TIA-1, quienes regulan la estabilidad del mensajero y la traducción. También la expresión del TNF- α está regulada a nivel traduccional durante los procesos de corte y empalme (splicing), transporte del mensajero y rompimiento o maduración de la proteína. La importancia relativa de cada etapa de regulación es aún desconocida.

i) Regulación epigenética y transcripcional de la expresión génica del TNF- α

Los cromosomas tienen la información necesaria que permite de manera totalmente regulada, (1) “prender” o “apagar” un gen, (2) controlar su propia duplicación, (3) reparación y (4) empaquetamiento en el interior del núcleo. Su nivel más fundamental consiste en estructuras repetitivas conocidas como nucleosomas. Cada nucleosoma contiene un núcleo de proteínas llamadas histonas (H2A, H2B, H3 y H4 organizadas en una estructura octamérica) alrededor del cual 145 pares de bases (bp) de DNA α -hélice de doble cadena las enrollan, esta estructura es referida como “cuentas de rosario”, además está compactada dentro de una estructura altamente ordenada conocida como fibras de cromatina que finalmente forman al cromosoma.

La cromatina condensada generalmente es considerada como una forma represora de la transcripción, y la cromatina modificada o “remodelada” permite la transcripción génica. Reportes recientes sugieren que los genes para citocinas están ensamblados dentro de la cromatina y, que esta puede ser un control importante en el mecanismo de regulación de la expresión génica de citocinas inducibles. Alteraciones en la estructura de la cromatina, como medida de la accesibilidad del DNA para DNAsa-I, han sido detectadas tras la activación celular para varias citocinas⁶⁵.

Los cambios en la estructura de la cromatina pueden ocurrir como respuesta de la célula a estímulos específicos a través de dos mecanismos generales:

- a) Complejos de remodelaje ATP-dependientes (SWI/SNF). Cuya función es la de desplazar, reorganizar y deslizar a los cromosomas. Estos complejos multiproteicos utilizan la energía del ATP para romper la estructura de la cromatina y generar un estado más accesible para que el complejo transcripcional acceda al DNA.
- b) Proteínas co-activadoras (CBP/p300) con actividad acetil transferasas de histonas o HAT (histone acetyl transferase). Contrariamente de algunos co-represores de la transcripción que tienen la actividad de desacetilar las histonas (HDAC, histone deacetyl transferase).

La acetilación de los residuos de lisina en las regiones amino-terminal que sobresalen de la estructura del nucleosoma, contribuye a neutralizar la carga neta de las histonas. Los residuos de lisina están cargados positivamente e interactúan fuertemente con los grupos fosfatos del DNA, incrementando su afinidad por la superficie del nucleosoma; la acetilación neutraliza la carga positiva de los residuos de lisinas y elimina las interacciones electrostáticas con los grupos fosfatos del DNA, favoreciendo un relajamiento de la estructura nucleosomal y, por tanto la interacción con el DNA. Lo que trae como consecuencia una estructura más relajada que favorece la actividad transcripcional. Contrariamente, cuando las histonas del nucleosoma se encuentran desacetiladas, el nucleosoma está más compactado y la transcripción es poco probable que ocurra.

Ha sido claramente demostrado que la hiperacetilación de histonas está asociada con genes activos, mientras, la hipoacetilación de histonas se correlaciona con una represión de la transcripción génica. Es conocido que el PMA induce la producción de TNF- α mediante el incremento de inhibidores de HDAC, lo cual favorece un estado hiperacetilado que permite la transcripción del gen. La fosforilación y la metilación en la región N-terminal de las histonas, también han sido relacionadas con la regulación de la expresión génica⁶⁵.

Después de la participación en la hiperacetilación de la cromatina en la vecindad de la región promotora del gen para TNF- α , los activadores transcripcionales inducibles (vías MAP cinasas) estimulan el reclutamiento de factores de transcripción, de proteínas co-activadoras CBP/p300 y de las polimerasas II, que se ensamblan sobre la región promotora e intensificadora del gen. Recientemente, varios autores han reportado que los promotores e intensificadores que controlan la expresión del gen para TNF- α , se ensamblan con los factores de transcripción formando un complejo multi-proteico ensamblado ordenadamente y se conoce como complejo intensificador (enhanceosoma)⁶¹.-Este termino ha sido acuñado para describir un complejo grande de nucleoproteínas que se ensamblan a partir de los factores de transcripción, dado que estos se unen cooperativamente a sus multiples sitios de unión en el intensificador o enhancer-.

En la organización de este complejo multi-proteico participan proteínas conocidas como factores de transcripción arquitectural, asociadas con la cromatina, y a factores de transcripción, las cuales son requeridas para construir el complejo de nucleoproteínas, y comprenden: proteínas de alta movilidad, HMGI(Y), [high mobility group I (Y)] y proteínas de choque frío CSP, (cold shock protein), que son responsables de mantener la arquitectura del DNA de tal forma que permiten el ensamble adecuado del complejo intensificador, generando así la unidad funcional transcripcional^{69,71}. Las proteínas HMGI se unen al surco menor del DNA sin considerar la secuencia y, como resultado de esto, dobla bruscamente a la molécula del DNA. Esta curvatura en la región del intensificador del DNA permite que los factores de transcripción interactúen adecuadamente⁷¹.

Como se mencionó anteriormente, la expresión del TNF- α puede ser inducida por una amplia gama de factores estimuladores. Así mismo, se ha observado que, dependiendo del estímulo extracelular, se pueden ensamblar distintos complejos intensificadores (interacción proteína-proteína) con un arreglo espacial único que permite su asociación a sitios de unión particulares en el promotor de TNF- α (interacción proteína-DNA)⁶⁹, manteniendo así la especificidad de la activación transcripcional del TNF- α ^{61,66,67}. No obstante, los distintos arreglos espaciales del complejo intensificador conllevan a la transcripción del gen, pero su intensidad es variable. En la figura 17 se presenta el modelo de un complejo intensificador inducido por LPS, el ensamble cooperativo formado por factores de transcripción/co-activadores dentro de la región promotora-intensificadora, resulta en la inducción sinérgica de la actividad del promotor y la inducción de la transcripción génica del TNF- α .

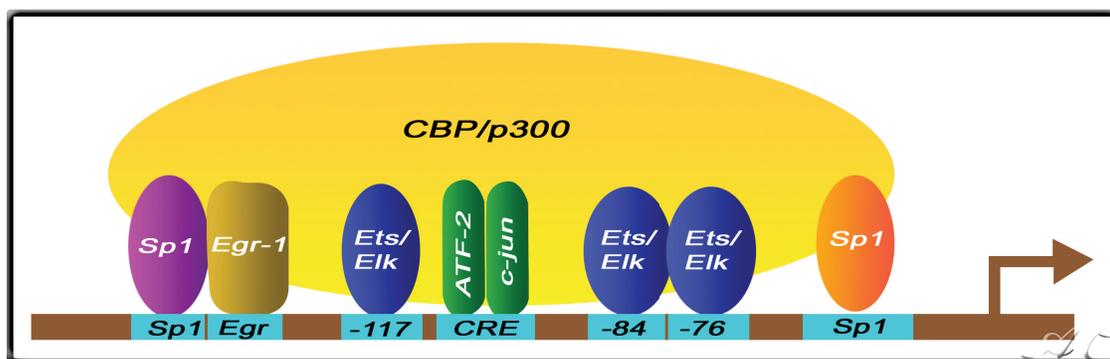


Figura 17. Modelo de un complejo intensificador (enhanceosoma) inducido por LPS. Un diagrama del ensamble de factores de transcripción sobre elementos cis dentro del promotor de TNF- α inducido por LPS. Estos factores interactúan constitutivamente o induciblemente con las proteínas CBP y p300, las cuales son requeridas para la expresión del gene TNF- α inducido por LPS.

ii) Regulación post- transcripcional de la expresión génica del TNF- α

Las modificaciones post-transcripcionales de los transcritos del RNA eucariótico, destinados a convertirse en RNAm's, abarcan: *a) adición de la caperuza*: en el extremo 5' del pre-RNA. En esta región se añade una caperuza de 7-metil-guanosina (7mG), la cual parece ser importante para el procesamiento posterior en el núcleo, protegiendo quizá el extremo 5' de la molécula del

ataque de nucleasas; esta caperuza parece estar implicada en el transporte del RNAm maduro de la membrana nuclear hacia el citoplasma. *b) adición de la cola poli-A:* en este proceso primero se corta enzimáticamente el extremo 3' del transcrito inicial en un punto situado a unos 10-35 ribonucleótidos de la secuencia AAUAAA, altamente conservada. Luego se produce la poliadenilación mediante la adición secuencial de residuos de ácido adenílico.

La secuencia de poli-A es esencial para el procesamiento, estabilidad y transporte del RNAm hacia el citoplasma. Y por último *c) Reacción de corte y empalme:* la eliminación de las secuencias intercaladas o intrones («int» por intercaladas), presentes en el transcrito inicial, se produce como resultado de un proceso de escisión y unión del RNA, denominado corte y empalme (splicing), sólo las secuencias conservadas o exones («ex» por expresadas) son conservadas en el RNAm maduro.

Una vez procesados y transportados al citoplasma, los precursores del RNAm se mantienen como moléculas de RNAm citoplasmáticas, "pool", de las cuales se seleccionan los mensajeros para ser traducidos. Todas las moléculas de RNAm's tienen un tiempo de vida media específico (el tiempo de vida media para el RNAm del TNF- α es 25 min en presencia o ausencia del LPS⁶⁸). Los RNAm's del TNF- α así como de otras proteínas involucradas en la respuesta inflamatoria son potencialmente inestables, y pueden ser estabilizados por la vía de MAP cinasa p38⁶⁹ (el mecanismo por el cual MAP cinasa p38 estabiliza el RNAm aún es desconocido). El control de la estabilidad del RNAm puede obtenerse a través de varios mecanismos: *a)* incremento en la expresión del gen, *b)* alta capacidad de recambio en los niveles del RNAm o *c)* por un mecanismo rápido en la terminación de la producción de la proteína.

Se ha demostrado que los RNAm inestables frecuentemente contienen elementos ricos en AU o ARE en su 3'UTR. Muchos de ellos están involucrados en la inflamación o la inmunoregulación, otros son factores de crecimiento u oncogenes. El motivo característico de los RNAm inestables es AUUUA, pero es variable el tamaño del ARE, el contenido de AU, el número de copias del motivo y su organización. Existen dos clases de sitios ARE, la clase I consiste en uno a más pentámeros (AUUUA) reiterados, mientras la clase II consiste de uno o más nonámeros (AUUUAUUUA) reiterados. Mientras, que la clase I es suficiente para promover la degradación de los transcritos maduros; ambas clases, I y II, regulan la producción de citocinas como TNF- α ^{70,71}. No obstante, la colita de poli-A del RNAm protege su degradación.

Existe un número de proteínas de unión con alta afinidad a sitios AREs, pero sus funciones no son del todo comprendidas. Se ha descrito la proteína Tristetrapolina (TTP) la cual está fuertemente implicada en el control de RNAm's inflamatorios. Esta proteína fue descubierta como un gen de respuesta temprana. TTP se une a AREs, actuando como una proteína desestabilizadora, que apaga la producción de citocinas inflamatorias.

La síntesis de TTP es inhibida a nivel del RNAm por bloqueo de la vía MAP cinasa p38⁷⁰⁻⁷³. La vía p38 también puede inducir la fosforilación de TTP y reducir su unión a sitios ARE, lo cual puede proveer un mecanismo por el cual p38 regula la actividad de TTP para estabilizar al RNAm. TTP ha sido reportado como un supresor de la actividad del promotor de TNF- α e IL-8.

Por otra parte, el LPS incrementa la estabilidad del RNAm de citocinas inflamatorias a través de inducir la fosforilación de TTP dependiente de la vía p38 y revertir su habilidad para apagar la expresión génica^{70,71,73}.

iii) Regulación traduccional de la expresión génica del TNF- α

Se ha observado que en el estado basal las células monocito/macrófago presentan un “pool” de RNAm para TNF- α que no son traducidos a proteínas, lo cual indica que existe una regulación a nivel traduccional. Así mismo, se ha reportado que la sobreexpresión de RNAm’s que contienen sitios ARE, no son eficientemente traducidos. Una posible explicación es que la vía p38 puede controlar la traducción del RNAm y su estabilidad, la cual es variable dependiendo del gen y el tipo celular. La relación entre el control traduccional y la estabilidad del RNAm no es bien entendida; sin embargo, la vía p38 puede ser bloqueada resultando en un desacoplamiento con la traducción^{64,69}.

12.3 ANEXO C

INHIBIDORES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL TNF- α

Glucocorticoides. Estos son ampliamente usados en terapias anti-inflamatoria e inmunosupresora; una de sus funciones es inhibir la expresión de genes de respuesta inflamatoria por mecanismos complejos y poco conocidos. Los glucocorticoides interfieren en las vías de señalización y en los mecanismos transcripcionales por su unión directa con el DNA, o por interacción proteína-proteína con otros factores transcripcionales que regulan a los genes inflamatorios, como el TNF- α . El receptor para glucocorticoides es un miembro de la familia de receptores nucleares de factores de transcripción (que incluye receptores para mineralocorticoides, progesterona, andrógenos, estrógenos, hormona tiroides, vitamina D y ácido retinoico). Los glucocorticoides, debido a su naturaleza lipofílica, difunden rápidamente a través de la membrana plasmática por un proceso de difusión pasiva y se unen al receptor de glucocorticoides (GR) dentro del citoplasma. La unión del ligando activa al receptor y éste se disocia de un complejo multiproteico formado por proteínas de choque térmico (hsp), hsp 90, hsp 70, hsp 56, hsp 40, y expone su señal de localización nuclear (NLS) para ser translocado en forma dimérica hacia el núcleo donde se ensambla directamente al DNA en los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) dentro de los promotores para los genes sensibles a glucocorticoides como el gen de la fosfolipasa A₂ α .

La unión del GR al sitio GRE resulta en un cambio conformacional que recluta a algunos coactivadores al complejo GR-DNA. Estos coactivadores, como CBP/p300 contienen actividad de acetilasa de histonas (HAT) que permite la transcripción de proteínas anti-inflamatorias como IL-10. También, el GR puede reprimir la expresión de genes por unión directa a un sitio GRE negativo (nGRE), que interfiere con la iniciación de la transcripción. No obstante, el efecto anti-inflamatorio más potente de los glucocorticoides, es por la interacción proteína-proteína entre el GR y otros factores de transcripción, particularmente AP-1 y NF- κ B. Este mecanismo permite la represión de la producción de un gran número de citocinas inflamatorias, incluyendo al TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8. El GR reprime la actividad transcripcional de NF- κ B porque interacciona físicamente con la subunidad p65, impidiendo su unión al DNA. Además, el GR puede evitar que NF- κ B medie la activación de genes por modificaciones de histonas o remodelamiento de la cromatina; el GR media la desacetilación de histonas resultando en un incremento de la compactación del DNA alrededor de las histonas. Finalmente, los glucocorticoides pueden reprimir la actividad de NF- κ B a través de la inducción de un inhibidor de la actividad transcripcional de NF- κ B, I κ B (el incremento de I κ B secuestra a NF- κ B en el citoplasma) o por medio de otras vías de señalización que prevengan la formación de NF- κ B activo. Con respecto al factor transcripcional AP-1 (c-Fos/c-Jun), el GR puede reprimir a AP-1 a través de la interacción proteína-proteína con la subunidad c-Jun. También se ha demostrado que los glucocorticoides suprimen la vía de señalización JNK, inhibiendo la fosforilación de c-Jun y reprimiendo la actividad de AP-1. Así mismo, suprime la vía de señalización p38 que estabiliza los RNAm's de los genes inflamatorios como TNF- α , IL-6, COX-2 y IL-8. La relativa importancia fisiológica de estos diferentes mecanismos no ha sido establecida⁷⁴.

Interleucina-10. Esta proteína supresora es una citocina pleiotrópica homodimérica que inicia una extensa variedad de actividades biológicas cuando se une a su receptor celular. IL-10 presenta una capacidad anti-inflamatoria que inhibe la producción de citocinas, la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y moléculas de clase II del MHC), secreción de quimiocinas y otros mediadores para macrófagos activados y células T, lo cual sucede por mecanismos poco definidos hasta la fecha; ya que la función principal de IL-10 es limitar la magnitud de la respuesta inmune. IL-10 se une a su receptor celular formado por 4 polipéptidos transmembranales, lo que inicia la transducción de señales, esta unión ligando-receptor induce la activación de las tirosincinasas Janus (Jak1) y TyK2, que se encuentran constitutivamente unidas al receptor; estas tirosinas fosforiladas en los aminoácidos 427 y 477 median la interacción directa con proteínas citosólicas denominadas transductores de señal y activadores de la transcripción (Stat3, Stat1, y Stat5). La fosforilación de proteínas Stat lleva a su homodimerización y heterodimerización; los dímeros Stat pueden ser entonces translocados al núcleo y dirigir la transcripción de genes que presentan secuencias de respuesta a Stat como IL-10, SOCS-1 y SOCS-3. Las proteínas SOCS-1 son conocidas por ser los principales inhibidores fisiológicos de IL-10, IL-4 e IFN- γ , y sabemos que ésta última es un potente activador de macrófagos e inductor de la expresión de TNF- α .

Se conoce que SOCS-1, al unirse a Jak cinasa, silencia la señalización porque obstruye físicamente el sitio activo de la cinasa, previniendo de esta forma la fosforilación de su sustrato regulando así la propia expresión de IL-10⁷⁵.

Por otra parte, en macrófagos estimulados con LPS, IL-10 inhibe parcialmente la síntesis de IL-1, IL-6 y TNF- α mediante la promoción de la degradación de los RNAm's regulados por los sitios ARE de estas citocinas. Más aún, la inhibición de la traducción de TNF- α por IL-10 es ejercido principalmente por la inhibición de la activación de la vía de señalización de MAP cinasa p38⁷⁶. Otra actividad anti-inflamatoria de IL-10 puede ser explicada por sus propiedades estabilizadoras sobre I κ B en el citoplasma, inhibiendo así la activación de NF- κ B inducida por LPS.

Como se mencionó anteriormente, NF- κ B es un factor transcripcional inducible que coordina la activación de numerosos genes en respuesta a patógenos y citocinas pro-inflamatorias. En su estado inactivo, NF- κ B está constitutivamente presente en el citoplasma como un heterodímero (p50-p65) enlazado a su proteína inhibidora κ B (I κ B). Citocinas proinflamatorias como TNF- α , activan a NF- κ B por estimular la actividad de I κ B cinasas (IKKs) las cuales fosforilan al inhibidor I κ B α sobre los residuos serina 32 y 36, marcándolos para una rápida degradación en el proteasoma. Esto capacita la liberación del complejo NF- κ B y su translocación hacia el núcleo para la activación de la transcripción génica. Por tanto, a través de la inhibición de IKKs, se impide la fosforilación del inhibidor I κ B α y su proteólisis, bloqueando la liberación de NF- κ B y así reprimiendo la transcripción de genes proinflamatorios como TNF- α ^{75,77}.

TGF- β . El factor de crecimiento transformante (TGF- β) es un polipéptido multifuncional implicado en la regulación de una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo: crecimiento, diferenciación y estado de activación de diferentes tipos celulares como células inmunes, apoptosis, adhesión y movilidad. La activación anormal o inhibición de estos procesos regulados por TGF- β están implicados en muchas enfermedades incluyendo cáncer. TGF- β juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasis de las células inmunes. También se ha propuesto que suprime la inflamación. El TGF- β induce la formación de un complejo heterodimérico (que probablemente contiene dos receptores tipo I y dos tipo II) transmembrana con actividad serina/treonina cinasa. La cascada de señalización se inicia por la unión de TGF- β con el receptor tipo II que recluta al receptor tipo I (ya que el receptor tipo I no se puede unir directamente a TGF- β); el receptor tipo II unido a su ligando fosforila al receptor tipo I, en una región rica en glicina-serina llamada caja-GS. La fosforilación del receptor tipo I es requerida para iniciar la propagación de la señalización intracelular, mediante la inducción de la fosforilación y activación de una familia de proteínas llamadas Smad's.

Las Smad's se clasifican en 3 grupos, con base en su estructura y función: *i*) Smad's activadas por el receptor o vía específica (R-Smad1, 2, 3,5 y 8), *ii*) Smad's mediadoras comunes citoplasmáticas (Co-Smad4, 10) y *iii*) Smad's inhibitorias (I-Smad6 y 7); las cuales transducen señales del citoplasma al núcleo. Las R-Smad's interaccionan directamente con el receptor tipo I activado, el cual las fosforila y éstas forman hetero-oligómeros con Co-Smad's y estos complejos, R-Smad/Co-Smad, son translocados hacia el núcleo. En el núcleo, las Smads pueden unirse directamente al DNA y cooperar con otros factores de transcripción, así como con proteínas co-activadoras y de esta manera, inducir la transcripción de los genes diana del TGF- β . Así mismo, también pueden interactuar con co-represores transcripcionales que reclutan a desacetilasas de histonas (HDAC). El balance entre co-activadores y co-represores, en el sitio de transcripción puede determinar si se activa o se reprime la transcripción génica^{78,79}.

PGE₂. La prostaglandina E₂ es el prostanoides más común. La biosíntesis de PGE₂ está regulada por tres reacciones enzimáticas. El ácido araquidónico (AA), un precursor de eicosanoides incluyendo prostanoides (productos de la vía de la ciclooxigenasa, COX) y leucotrienos (productos de la vía 5-lipoxigenasa, LOX), se encuentra asociado a la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos de membrana, y es liberado por la acción hidrolítica de la enzima fosfolipasa A₂ (PLA₂) activada por fosforilación a través de proteínas cinasas MAPK's.

El AA es metabolizado a un intermediario prostanoides inestable, PGH₂, por la acción de enzimas COX y la formación de los prostanoides específicos es llevada a cabo por específicas enzimas terminales, como la enzima PGE sintetasa que convierte PGH₂ a PGE₂. La PGE₂ producida es liberada de las células y actúa sobre 4 tipos de receptores, EP1, EP2, EP3 y EP4, todos son acoplados con la vía de señalización de proteína-G trimérica. La PGE₂ es importante en varios eventos biológicos, tales como: funciones neuronales vía EP1, la reproducción femenina, hipertensión y tumorigénesis vía EP2, fiebre, protección de la mucosa gástrica e inflamación asociada resorción medular vía EP4⁸⁰.

La ciclooxigenasa es la enzima que limita la velocidad de reacción en la producción de prostaglandinas. Existen dos isoformas de la enzima COX, la isoforma COX-1, la cual es expresada constitutivamente en una extensa variedad de células, mientras COX-2 es una enzima estímulo-inducible (IL-1, TNF- α , LPS) que ha sido implicada en la patogénesis como inflamación, dolor, fiebre y cáncer. Con respecto al cáncer, se ha observado que los niveles de COX-2 se encuentran elevados en varios tipos de cánceres; y en el cáncer pulmonar, COX-2 a través de PGE₂ regula la invasión y metástasis del carcinoma pulmonar de células no pequeñas de una manera autocrina y parácrina, vía señalización del receptor EP4^{80,81}. Además, la expresión de COX-2 está asociada con un pobre pronóstico del paciente.

El mecanismo preciso responsable de la elevación de la expresión de COX-2 en cáncer pulmonar, no es completamente entendido; sin embargo, el benzo(a)pireno (un carcinógeno contenido en el humo del cigarro) puede inducir la expresión de COX-2 y la producción de PGE₂⁸¹. Es conocido que las prostaglandinas de la serie E tienen propiedades anti-inflamatorias sobre macrófagos activados por LPS. Existen varios reportes que demuestran que la PGE₂ inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6 en macrófagos activado por LPS; de hecho, se ha observado que la PGE₂ ejerce su efecto inhibitorio a nivel de proteína y expresión del RNAm para TNF- α en macrófagos activados por LPS. El mecanismo por el cual la PGE₂ ejerce su efecto inhibitorio sobre la producción de citocinas pro-inflamatorias aún es desconocido; no obstante, se ha observado que su presencia se asocia con un incremento de la citocina inmunosupresora IL-10 y una disminución de IL-12⁸².

12.4 ANEXO D

ESTIMULACIÓN CELULAR

1. ESTIMULACIÓN POR LPS

En una variedad de tipos celulares la biosíntesis del TNF- α es estímulo-específica. En células monocito-macrófago diversos estímulos extracelulares pueden inducir la expresión génica a través de diferentes vías señalización que convergen en la activación transcripcional del gen para TNF- α ⁷¹. En general, la transmisión de señales involucra la interacción de un ligando extracelular con una proteína transmembranal (receptor). El receptor en su dominio citoplásmico posee una actividad proteína cinasa y ésta es activada cuando el ligando se une al dominio extracelular del receptor; la autofosforilación capacita al receptor para asociarse y activar a otras proteínas blanco. La amplificación de la señal se lleva a cabo por la fosforilación de proteínas serina/treonina cinasas referidas como proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) que fosforilan y controlan la actividad de las proteínas involucradas en los eventos metabólicos y transcripcionales.

La estimulación de monocitos por el lipopolisacárido (LPS) es el proceso de señalización más estudiado. El LPS es el componente principal de la membrana externa de bacterias Gram-negativas e induce la producción de TNF- α . El LPS (ligando) se une a una proteína plasmática LBP (del inglés: LPS-binding protein) que lo conduce hacia una proteína membranal CD14 (antígeno marcador mielóide) que a su vez lo transfiere a un receptor transmembranal TLR4 (del inglés: toll-like receptor 4) unido a una proteína accesoria MD2, este complejo TLRR4-MD2 es responsable de la señalización intracelular por activación de MAP cinasas, incluyendo las vías: proteína cinasa regulada por señal extracelular (ERK), cinasa N-terminal c-Jun (JNK) y p38 así como la vía que incluye la cinasa I κ B (IKK)-NF- κ B¹¹⁸.

Estas vías de señalización activan una variedad de factores de transcripción como NF- κ B (p50/p65) y AP-1 (c-fos, c-Jun) los cuales coordinan la inducción de genes inflamatorios entre ellos el TNF- α ^{71,118} (ver Figura 16).

2. ESTIMULACIÓN POR PMA

Por otro lado, los ésteres de forbol como el forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) referidos como promotores de tumor (sustancias que no son en sí mismas carcinogénicas, pero incrementan la potencia de los carcinógenos) su efecto biológico está en función del tipo celular, de la concentración y del tiempo de exposición. Por ejemplo, en células monocíticas incubadas con ésteres de forbol por tiempos prolongados (24-72 horas) inducen diferenciación celular, caracterizada por el incremento de moléculas de adhesión en membrana como CD11b, CD11c e integrina β 2^{119,122}. En contraste, la misma cantidad de células en presencia de ésteres de forbol por tiempos más cortos (10 min – 4 h) induce la estimulación celular, reflejada en la fosforilación de factores de transcripción como son AP-1 y expresión de RNAm de JUN, TNF- α y IL-1¹²⁰.

Esta diversidad de respuestas biológicas generadas por los ésteres de forbol es debida a su analogía estructural al diacilglicerol (DG), producto metabólico del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) componente minoritario de la membrana plasmática. Los ésteres de forbol y el DG juegan un papel importante en la transmisión de señales extracelulares y en la señalización intracelular a través de la activación de una enzima que fosforila proteínas del grupo serina/treonina cinasa denominada proteína cinasa C (PKC). La familia de estas cinasas es heterogénea y consiste en isoenzimas que difieren en su estructura, requerimientos de cofactores, distribución de tejidos y localización subcelular. La significancia biológica de la heterogeneidad de la familia de PKC aún es desconocida; no obstante, se ha observado que cada isoenzima fosforila distintos sustratos y consecuentemente media distintas respuestas biológicas en la célula donde es expresada. Además, la compartimentalización intracelular que presentan las distintas isoenzimas de PKC pueden dirigir la especificidad de sus sustratos.

En mamíferos se han identificado 10 isoenzimas de PKC codificados por 9 genes, estas isoenzimas pueden ser divididas dentro de 3 clases basados en su estructura primaria y propiedades bioquímicas¹²¹.

- 1) Isoenzimas PKC clásicas (cPKC), incluyen PKC α , β I, β II y γ ; son activadas por DG y ésteres de forbol en presencia de calcio y fosfolípidos.
- 2) Isoenzimas PKC nuevas (nPKC) comprende PKC δ , ϵ , η y θ ; son activadas por DG y ésteres de forbol requieren la unión de fosfolípidos pero no de calcio.

- 3) Isoenzimas PKC atípicas (aPKC) incluye PKC ζ , λ/ι ; requieren la presencia de fosfolípidos como fosfatidilserina, sin embargo, no son activadas por DG y ésteres de forbol, además de no poseer el sitio de unión para el calcio.

La función biológica de la PCK está regulada por tres eventos: (1) maduración, (2) activación y (3) translocación. La maduración es alcanzada por la fosforilación de residuos serina/treonina del dominio catalítico, su activación llevada a cabo por varios activadores que se unen al dominio regulatorio de las isoenzimas PKC como son: la fosfatidilserina necesaria para todas las isoenzimas de PKC, iones de calcio para la clase cPKC, el DG y los ésteres de forbol para las clases cPKC y nPKC, simultáneamente a la activación las isoenzimas de PKC se translocan hacia compartimentos particulares subcelulares como a la membrana plasmática y al aparato de golgi o núcleo, estos dos últimos procesos contribuyen a la regulación temporal, espacial y específica de cada isoenzima de PKC¹²¹.

Con respecto a la expresión de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β y IL-6) en células monocíticas U-937 (linfoma histiocítico humano) existen ciertos reportes, donde se propone, que específicas isoenzimas de PKC juegan un papel importante sobre la inducción de la síntesis de estas citocinas pro-inflamatorias^{122,123}. Dicha hipótesis muestra que las isoenzimas de PKC son translocadas del citosol hacia la membrana, y se ha reportado que en monocitos U-937 tratados con PMA, se translocan las isoformas PKC α , β II, δ y ϵ fosforilando a ciertas MAP cinasas, como a Raf (serina/treonina cinasa) que transmite la señal extracelular activando el factor de transcripción AP-1 y el incremento en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias¹²³ (ver Figura 18).

En células de mamíferos, la cascada se inicia en la membrana plasmática por la activación de receptores con actividad cinasa de tirosina debido al enlace con su ligando típicamente EGF (del inglés: epidermal growth factor) o PDGF (platelet derived growth factor). Estos receptores activados se asocian con una proteína adaptadora llamada Grb2 a través de sus dominios SH2. Y por medio de sus dominios SH3, se asocia con otra proteína llamada SOS, que es una proteína intercambiadora de GDP por GTP; cuando SOS se encuentra activada, se acerca a la membrana y esta cercanía es suficiente para activar el intercambio de GTP por GDP a Ras, que es una proteína G monomérica (activa sólo cuando tiene enlazado GTP) y que se encuentra adosada a la membrana plasmática a través de un grupo farnesilo. Cuando Ras está activada entra en contacto con otra proteína llamada Raf atrayéndola del citosol a la membrana plasmática e indirectamente induciendo su fosforilación; la cinasa responsable de este evento no se ha identificado aún. La fosforilación de Raf la activa y esta activación lleva a la fosforilación de otra enzima llamada MEK, que es una cinasa que fosforila tanto residuos tirosina como treonina y su sustrato es otra cinasa llamada ERK/MAP. A partir de este punto todos los episodios de activación se deben a la activación de cinasas de residuos de serina/treonina^{122,123}.

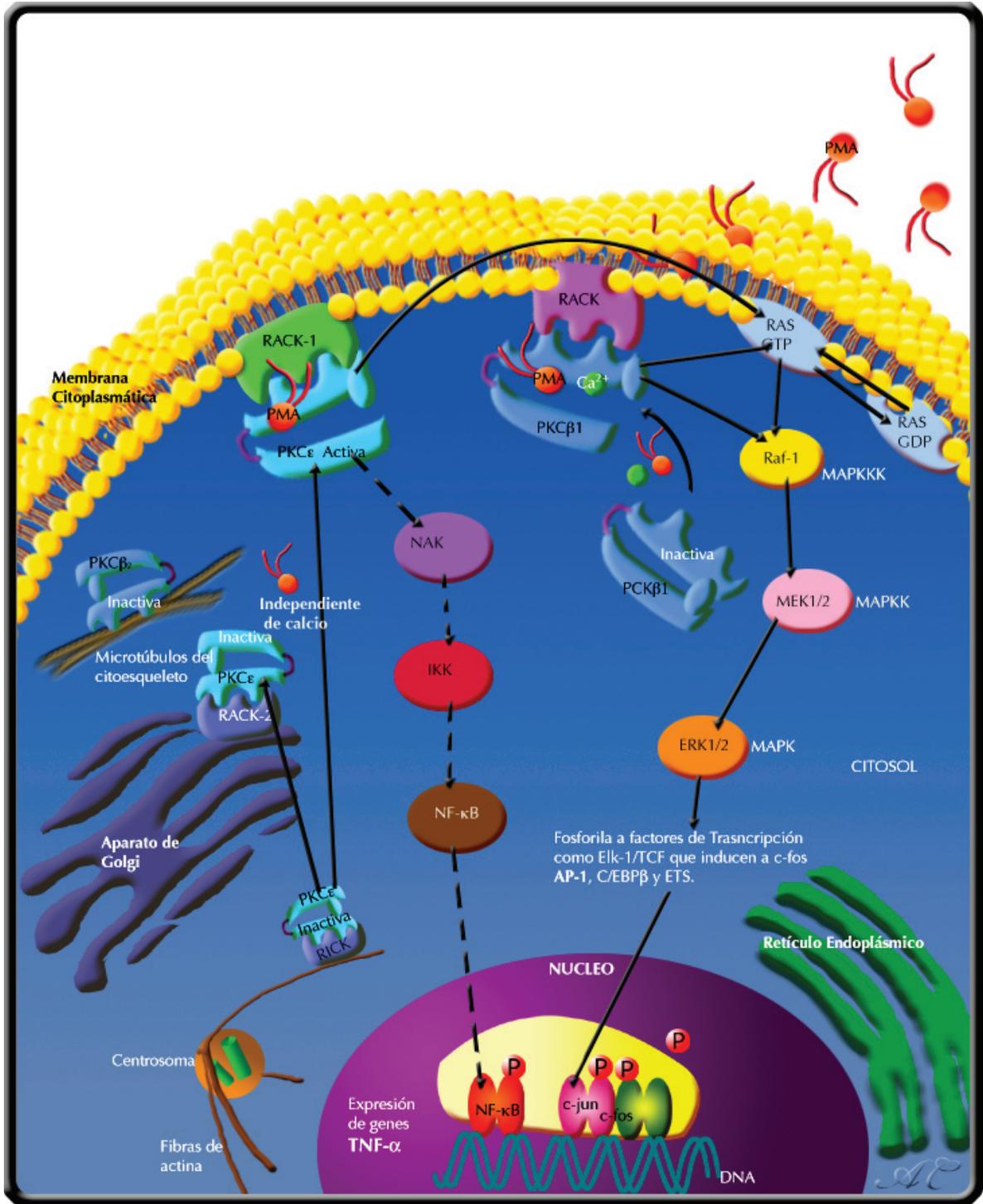


Figura 18. Señalización intracelular activada por PMA en células U-937.
Cytokine **11** (1999) 839-848.

12.5 ANEXO E

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución Amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2

Solución A (10 X)	NaCl	80 gr
	KCl	2 gr
	CaCl ₂	1 gr
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1 gr
	H ₂ O milli-Q c.b.p.	1000 mL
Solución B (10 X)	KH ₂ PO ₄ ·12 H ₂ O	28.98 gr
	Na ₂ HPO ₄	11.5 gr
	KH ₂ PO ₄	2 gr
	H ₂ O milli-Q c.b.p.	1000 mL

Solución de trabajo PBS 1X, se mezclan 100 mL de la solución A con 700 mL de agua milli-Q y adicionando 100 ml de la solución B, aforar a 1 litro.

Amortiguador PBS 0.01M, pH 7.4 Libre de calcio y magnesio

NaCl	80 gr
KH ₂ PO ₄	2 gr
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	14.4 gr
KCl	2 gr
H ₂ O milli-Q c.b.p.	1000 mL

Solución de trabajo PBS 1X libre de calcio y magnesio, se toman 100 ml de la solución concentrada y se afora a 1 litro con agua milli-Q.

PMA

Se reconstituyó en DMSO a una concentración de 0.1 mg/mL y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alícuotas de $10\text{ }\mu\text{L}$, soportando 3 ciclos de congelación-descongelación. La solución de trabajo se preparó diluyendo la solución antes mencionada 1:100 en PBS 1X. Concentración final 25 ng/mL.

Ionicina

Se reconstituyó en alcohol etílico absoluto a una concentración de 0.5 mg/mL y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La solución de trabajo se preparó diluyendo la solución antes mencionada 1:10 en PBS 1X. Concentración final $10\text{ }\mu\text{g/mL}$.

BFA

Se reconstituyó en DMSO a una concentración de 5 mg/mL y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alícuotas de $20\text{ }\mu\text{L}$, soportando 3 ciclos de congelación-descongelación. La solución de trabajo se preparó diluyendo la solución antes mencionada 1:10 en PBS 1X. Concentración final $10\text{ }\mu\text{g/mL}$.

Azul Tripano

Filtrar de 5 a 10 ml de solución salina o PBS estéril, y mezclar 1 mL de azul tripano al 0.4%, en 4 mL de PBS o solución salina, homogenizar y dejar reposar antes de usarse.

Tripsina

Se diluye una décima parte con PBS libre de calcio o magnesio filtrado.