



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**CARACTERIZACIÓN DE LA ADHESIÓN DE
CÉLULAS METASTÁSICAS HUMANAS A
CULTIVOS ENDOTELIALES HUMANOS
ACTIVADOS POR FACTORES SOLUBLES DERIVADOS
DE CÉLULAS TUMORALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. SUSANA ENRIQUETA FRÍAS GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT
Por la beca recibida con registro de
estudiante No. **165984**

Así como a los proyectos
45519-M de CONACyT,
IN-205703-3 de DGAPA

A mi Comité Tutorial por supervisar y
asesorar el desarrollo del proyecto

Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Dra. Rebeca López Marure
Dr. Jorge Meléndez Zajgla

“Estudiad el “abecé” de las ciencias antes de intentar alcanzar las cimas. No emprendáis jamás un nuevo capítulo si no sabéis perfectamente el precedente. No tratéis jamás de compensar la insuficiencia de vuestros conocimientos con suposiciones e hipótesis, ni siquiera las más audaces...

Aprended a ser observadores y pacientes. Habituaos a hacer los trabajos científicos más ordinarios. Estudiad, comparad, acumulad hechos... Sin los mismos no podréis nunca elevaros, sin los mismos vuestras teorías serán esfuerzos vanos. Pero aún estudiando, experimentando, observando, esforzaos por no quedar en la superficie de los hechos. Tratad de penetrar el misterio de su origen, buscad con perseverancia las leyes que los regulan. En segundo lugar, modestia. Jamás penséis saberlo todo ya... No permitáis que el orgullo se apodere de vosotros; os hará obstinar cuando sería necesario ceder; os hará perder la medida de la objetividad... En tercer lugar, pasión. Recordad que la ciencia exige al hombre toda su vida. Y si tuvierais dos vidas, las mismas no serían suficientes. Es una fuerte tensión y una gran pasión lo que la ciencia exige del hombre...”

Iván Pavlov (1849-1936)

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABREVIATURAS I	iii
INTRODUCCIÓN	1
CÁNCER	1
METÁSTASIS	3
EVENTOS DE LA METÁSTASIS	5
DISPERSIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES	5
MOTILIDAD E INVASIÓN	5
EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE	6
PARO Y EXTRAVASACIÓN	9
ESTABLECIMIENTO DE LA METÁSTASIS	10
ANGIOGÉNESIS	11
BIOLOGÍA DEL ENDOTELIO	13
FENOTIPO CONSTITUTIVO DEL ENDOTELIO	16
FENOTIPO ACTIVADO DEL ENDOTELIO	17
INFLAMACIÓN, ENDOTELIO Y CÁNCER	19
PRINCIPALES MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN EN LA	
RELACIÓN INFLAMACIÓN-CÁNCER	22
ÓXIDO NÍTRICO	22
QUIMIOCINAS	24
CITOCINAS	25
EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA	26
LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL NF- κ B	27
FAMILIAS DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	30
INTEGRINAS	30
CADHERINAS	31
SELECTINAS	32
SELECTINA-E	34
SUPERFAMILIA DE INMUNOGLOBULINAS	35
VCAM-1	35
ICAM-1	36
EL CÁNCER DE GLÁNDULA MAMARIA Y SUS FACTORES	
DE RIESGO	38
ANTECEDENTES	41
EL PROCESO METÁSTASICO APROVECHA ELEMENTOS	
DE LA INFLAMACIÓN	41
¿ LOS TUMORES PREPARAN SU INVASIÓN ?	43
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
MATERIAL Y MÉTODOS	46
OBTENCIÓN DE LOS FACTORES SOLUBLES TUMORALES	46
CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DERIVADAS	
DE VENA UMBILICAL HUMANA (HUVECs)	47
ENSAYOS DE ADHESIÓN	48

INMUNOANÁLISIS	50
CITOMETRÍA DE FLUJO	51
ENSAYO DE RETARDO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA	52
OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNA NUCLEAR	52
FOSFORILACIÓN DEL OLIGONUCLEÓTIDO	53
PREPARACIÓN Y CORRIMIENTO DEL GEL DE	
POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE PARA ADN	54
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
RESULTADOS	55
ENSAYOS DE ADHESIÓN BASAL	55
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EN LOS FACTORES	
SOLUBLES TUMORALES	57
ADHESIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES ZR 75.30,	
MCF-7 Y HeLa A DISTINTAS SUPERFICIES	57
ENSAYOS DE ADHESIÓN HETERÓLOGA	59
ADHESIÓN HETERÓLOGA DE CÉLULAS U937	59
ADHESIÓN HETERÓLOGA DE CÉLULAS ZR 75.30	60
ADHESIÓN HETERÓLOGA DE CÉLULAS MCF-7	61
ADHESIÓN HETERÓLOGA DE CÉLULAS HeLa	62
ENSAYOS DE ADHESIÓN HOMÓLOGA	63
CITOMETRÍA DE FLUJO	64
INMUNOANÁLISIS	67
ENSAYO DE RETARDO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA	68
RESUMEN GENERAL DE LOS EFECTOS DE LOS	
TRATAMIENTOS SOBRE LAS HUVECs	69
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	72
LA ADHESIÓN BASAL	74
CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LOS FACTORES	
SOLUBLES TUMORALES (FST)	76
EL MODELO DE ADHESIÓN HETERÓLOGA	78
EL MODELO DE ADHESIÓN HOMÓLOGA	80
CITOCINAS Y FACTORES SOLUBLES TUMORALES	
FAVORECEN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	
EN HUVECs	80
LOS FST DE CÉLULAS ZR 75.30 PROMUEVEN LA	
EXPRESIÓN DE SELECTINA-E EN HUVECs	81
LOS FST DE CÉLULAS ZR 75.30 PROMUEVEN LA	
EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	
ICAM-1 Y VCAM-1 EN HUVECs	83
LOS FST DERIVADOS DE CÉLULAS ZR 75.30 ACTIVAN	
LA VÍA DEL NF- κ B EN HUVECs	87
CONCLUSIONES	90
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXOS	
IMPORTANCIA DEL LPS Y LA POLIMIXINA-B EN EL PROYECTO	I
SOLUCIONES	IV
ABREVIATURAS	VI

RESUMEN

La interacción entre el endotelio vascular y las células metastásicas se ha propuesto como un paso importante en la diseminación tumoral. En este proceso la célula metastásica debe adherirse a la célula endotelial que normalmente presenta una membrana con una baja capacidad de adhesión.

Previamente, hemos demostrado que la leucemia humana secreta factores que inducen un estado pro adhesivo en las células endoteliales humanas derivadas de la vena umbilical.

En este trabajo se comparó la capacidad de los factores solubles tumorales (FST) de células de cáncer de glándula mamaria humana con alto potencial invasivo (ZR 75.30) con los de bajo potencial (MCF-7) para producir un aumento en la adhesión de células U937, la expresión de moléculas de adhesión endotelial selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1, así como la activación del factor de transcripción NF- κ B. Se evaluaron los mismos efectos con los FST de células de un tipo de cáncer distinto proveniente de un carcinoma de cérvix (HeLa).

Sólo el pre-tratamiento de células endoteliales con los FST de las células ZR 75.30 indujo un cambio en el fenotipo endotelial haciéndolo más susceptible a la adhesión de células U937, MCF-7 y a las mismas células ZR 75.30. Los FST de MCF-7 y HeLa no tuvieron este efecto.

La expresión de moléculas de adhesión selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 en las células endoteliales, sólo se incrementó cuando estas células fueron pre-tratadas con los FST de ZR 75.30.

El factor de transcripción NF- κ B fue activado por los FST de ZR 75.30 casi a los mismos niveles que se alcanzan con TNF α . En contraste, los FST de MCF-7 y HeLa indujeron un modesto incremento en los niveles nucleares de NF- κ B.

En conclusión, los FST de una célula de cáncer de glándula mamaria humana con alto potencial invasivo (ZR 75.30) son capaces de promover un fenotipo endotelial similar al que induce el TNF α , mientras que los FST de células con bajo potencial invasivo (MCF-7) tuvieron efectos cercanos a las condiciones basales.

ABSTRACT

The interaction between vascular endothelium and metastatic cells have been proposed to be an important step in tumoral dissemination. In this process metastatic cells adhere to endothelial cells that normally display low capacity of adhesion on it's membrane. Previously, we have demonstrated that human leukemia produces factors that induce a pro-adhesive state in human endothelial cells derived from umbilical vein.

In this work, I compared the ability of tumoral soluble factors (TSF) from a human breast cancer cell line with high invasive capacity (ZR 75.30) against one with low invasive capacity (MCF-7) to promote adhesion of U937 cells, expression of adhesion molecules like E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1, and also the activation of nuclear transcription factor NF- κ B. The same effects were evaluated for TSF derived from cells from a cervical carcinoma (HeLa).

The results showed that only pre-treatment of endothelial cells with TSF from ZR 75.30 induced adhesion of U937, MCF-7 and ZR 75.30 cells on endothelial cells suggesting an activated endothelial phenotype. The TSF from MCF-7 and HeLa cells didn't have this effect.

The expression of the cell adhesion molecules E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on endothelial cells were only increased when cells were pre-treated with ZR 75.30 TSF.

The nuclear transcription factor NF- κ B was activated with ZR 75.30 TSF almost to similar levels as those reached by TNF α . In contrast, TSF from MCF-7 and HeLa induced only a modest increased in NF- κ B activation.

In conclusion, TSF from a human breast cancer cell line with high invasive capacity (ZR 75.30) are able to promote an endothelial activated phenotype similar to the one induced by TNF α , whereas the TSF from cells with low invasive potential (MCF-7) had no significant effects.

ABREVIATURAS I

CAMs	Moléculas de adhesión celular
CEs	Células endoteliales
CM	Células metastásicas
CT	Células tumorales
EMSA	Ensayo de retardo en la movilidad electroforética
EuHe	Células humanas obtenidas de paciente con linfoma de Hodgkin
Eusebia	Células obtenidas de ratones inyectados con EuHe
FST	Factores solubles tumorales
HeLa	Línea celular humana derivada de cáncer de cérvix
HUVECs	Células endoteliales derivadas de vena umbilical humana
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN γ	Interferón gama
IL-	Interleucina
IRF	Índice relativo de fluorescencia
MCF-7	Línea celular humana derivada de adenocarcinoma mamario
MEC	Matriz extracelular
NF- κ B	Factor nuclear de la cadena kappa de las inmunoglobulinas de células B
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
U937	Línea celular de mieloma humano
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares-1
ZR 75.30	Línea celular humana derivada de cáncer de glándula mamaria con alto potencial invasivo

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

El cáncer, condición en la que las células de un organismo proliferan descontroladamente, puede considerarse como un proceso de micro evolución que se produce en una escala temporal de meses o años en una población de células del cuerpo, y que a su vez, depende de los mismos procesos de mutación y selección natural que gobiernan la evolución a largo plazo de todos los organismos vivos (Alberts *et al*, 2002). El cáncer resulta de un largo periodo de latencia, durante el cual ocurren y se acumulan mutaciones que, con el paso del tiempo, generan alteraciones en los mecanismos que regulan la diferenciación y la proliferación de las células afectadas. Se dice que el cáncer es multifactorial porque los factores que pueden causar daño al ADN y transformar una célula normal en cancerosa o tumoral son muy diversos, y pueden pertenecer a cualquiera de las siguientes tres categorías: agentes biológicos (virus, parásitos y bacterias); químicos (arsénico o asbesto entre otros) y físicos (exposición a radiación ionizante). Se habla también de que los cambios celulares pueden ser genéticos o epigenéticos, si ocurrieron – respectivamente – modificaciones en los genes (inserción, delección, translocación), si estos ocurren en células germinales o si el cambio no se da en el ADN sino en la expresión de genes (metilación por ejemplo) (Lewin, 2000).

Un posible paso inicial para que una célula normal pueda generar cáncer es la alteración de un gen que participa en la regulación del ciclo celular. Esta alteración puede ocurrir por medio de mutaciones, que resultan en un aumento o disminución en su expresión (Yokota, 2000). Durante la progresión tumoral la acumulación de mutaciones en diversos genes lleva a la pérdida de regulación en el metabolismo del ADN. Esta inestabilidad genética ha sido estudiada extensamente. Se ha demostrado que es común que las células tumorales presenten un gran número de mutaciones a lo largo del genoma, las cuales se presentan en forma aleatoria (Loeb y Loeb, 2000). Durante la progresión del

cáncer se van generando clonas que pueden tener más o menos ventajas que otras para sobrevivir y proliferar en su microambiente. Por lo tanto, dentro de un tumor existe una selección que favorece a las más aptas que por lo general pierden en mayor proporción las características del tejido de origen. Por lo que la progresión de una hiperplasia a un cáncer metastásico resulta de las mutaciones en el genoma de la célula tumoral y la selección que ejerce el microambiente tisular donde se desarrolla. Al aumentar el número de células, el tumor empieza a incrementar su volumen. Mientras se mantenga por debajo de 1 a 2 mm de diámetro puede subsistir por la difusión de nutrientes de vasos cercanos (Kerbel, 2000), pero al crecer más se encuentra con limitantes para su desarrollo tales como el tipo de tejido adyacente y la reducción en la cantidad de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento (Loeb y Loeb, 2000). Esta falta de oxígeno genera un estado de hipoxia que favorece la síntesis y secreción de factores angiogénicos que promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos. Este proceso implica la degradación de la lámina basal de los capilares cercanos, división de células endoteliales y formación de capilares en la periferia y el interior del tumor (Darnell y Lodish, 1999) (Figura 1). En la mayoría de los casos se ha documentado que la formación de esta nueva vasculatura se debe a la secreción ectópica por parte de las células tumorales de factores angiogénicos como los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), los factores de crecimiento transformante alfa y beta (TGF α y β) y la interleucina-8. Es importante resaltar que el VEGF se expresa por la mayoría de los tipos de tumores y que la angiogénesis no es exclusiva de tumores sólidos (Kerbel, 2000).

Cuando una célula se vuelve cancerosa, son tres los fenómenos que tienen lugar: Inmortalización, que se refiere a la propiedad de crecimiento indefinido. Las células eucariotas tienen como característica fundamental un periodo de vida preestablecido cuyo crecimiento y división están altamente regulados. Al límite del número de divisiones celulares se le llama "Límite de Heiflick". Esta propiedad se pierde cuando una célula se torna cancerosa.

Transformación, es cuando las células llegan a ser independientes de factores que normalmente necesitaban para su crecimiento y adquieren habilidad para sobrevivir y proliferar en condiciones en las que normalmente no lo harían.

Y finalmente, metástasis, que describe la etapa en la que la célula cancerosa desarrolla la capacidad de romper las láminas basales que los mantienen contenidos e invadir el tejido circundante, moviéndose así desde su lugar de origen para establecer una nueva colonia en cualquier parte del cuerpo (Lewin, 2000).

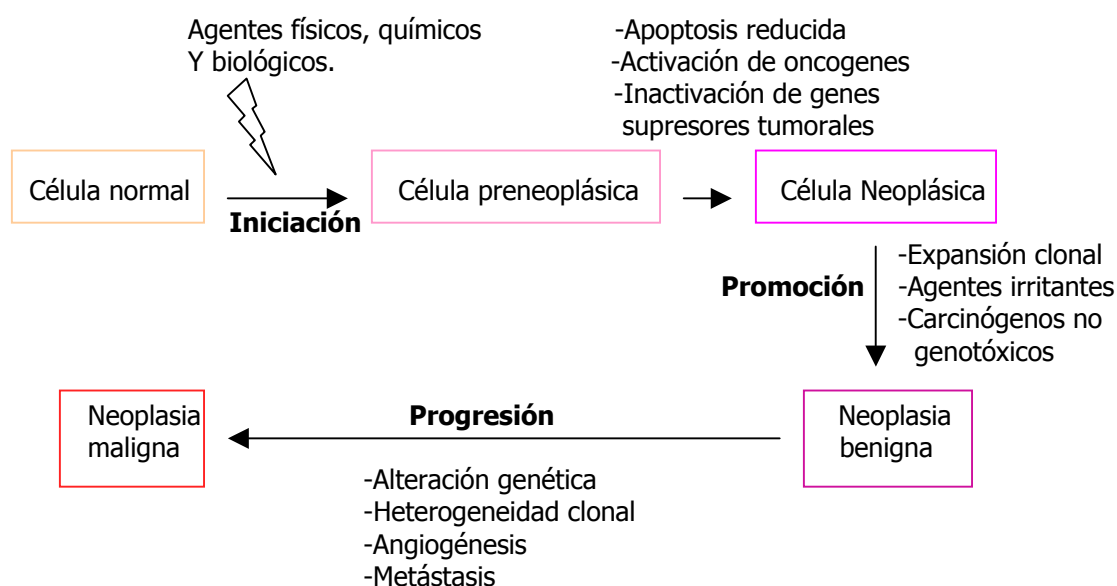


Figura 1. El proceso neoplásico ocurre en múltiples etapas, es multifactorial y ocurre al azar. Una célula normal puede convertirse en cancerosa por su interacción con agentes físicos, químicos o biológicos, que inician a la célula en la progresión tumoral y le confiere una probabilidad mayor de malignización. Al promoverse la división, la célula iniciada forma un foco neoplásico benigno, el cual puede progresar hasta un fenotipo maligno. Esta promoción no es controlada por las células tumorales y cualquier ventaja fenotípica es un proceso totalmente aleatorio.

METÁSTASIS

Cuando una masa tumoral se implanta en un sitio separado o distante del tumor de origen, se dice que existe una metástasis. La capacidad de invasión de las células tumorales les permite penetrar en el interior de los vasos sanguíneos, linfáticos y, en menor proporción, en las cavidades corporales. A esta característica

de algunos tumores se le denomina malignidad y es, de hecho, la principal causa de mortalidad por cáncer (Ruoslahti, 1996).

El proceso metastásico consiste en una serie de pasos secuenciales por los que avanzan las células tumorales; si todos se llevan a cabo exitosamente se alcanza un estado con capacidad metastásica. Estos pasos incluyen el desprendimiento de las células del tumor primario, las cuales deben atravesar la matriz extracelular para poder hacer su entrada a la circulación (intravasación), sobrevivir en la circulación, detenerse en un nuevo sitio distante del tumor de origen, extravasarse para invadir el tejido circundante, pasar por un proceso de iniciación y crecimiento, así como de vascularización o angiogénesis para mantenerse como un tumor metastásico (Chambers *et al*, 2002) (Figura 2).

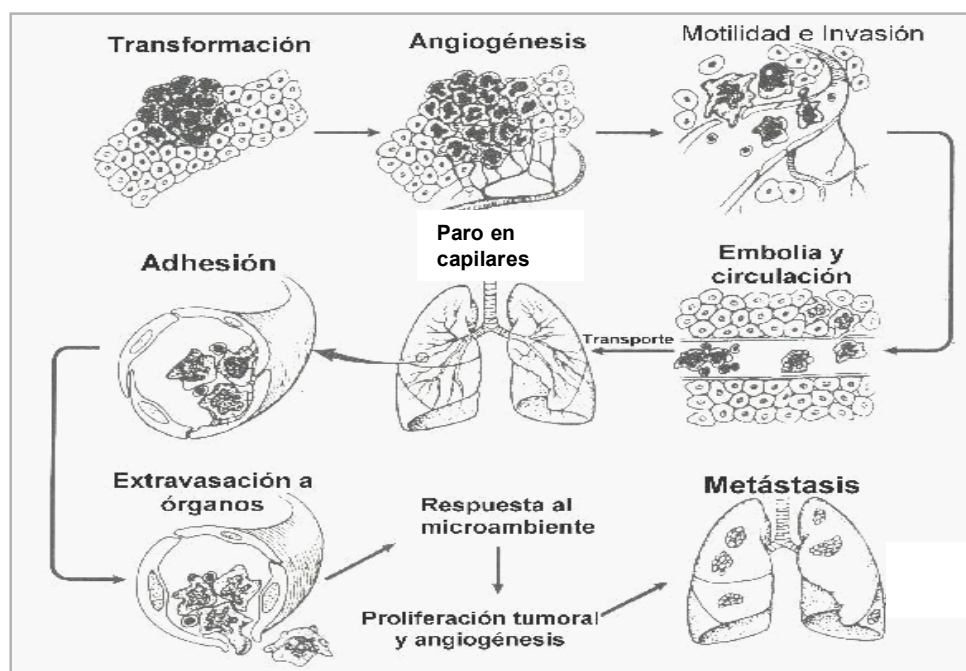


Figura 2. El resultado de la metástasis depende de la interacción de las células metastásicas con el microambiente del órgano al que se va a colonizar. Además representa el punto final de diversos eventos letales en los que pocas células sobreviven (Imagen tomada de Fidler, 1990).

Las interacciones intercelulares son un tema común e importante en la biología del desarrollo y la patología del cáncer. Se ha comparado el movimiento de las células metastásicas con aquel que ocurre en los embriones, particularmente los procesos

de adhesión y separación, locomoción celular y direccionalidad. Sin embargo, mientras que la morfogénesis coordina finamente el "encendido y apagado" de estos procesos, en la metástasis no se cuenta con ese control, por lo que se llega a un estado de desorden en el tejido que suele culminar con la muerte del paciente (Weiss, 2000a).

En cada uno de los eventos del proceso metastásico intervienen diversas moléculas de adhesión celular (CAMs). Son más de 50 CAMs las que se han asociado a la promoción de la cascada metastásica. Estas CAMs se encuentran clasificadas en cuatro grandes grupos: i) *superfamilia de las inmunoglobulinas*, ii) *cadherinas*, iii) *selectinas* y iv) *integrinas* (Okegawa *et al*, 2004).

EVENTOS DE LA METÁSTASIS

DISPERSIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES

La gran mayoría de las metástasis tienen un origen epitelial por lo que la expresión de las moléculas de adhesión intercelular que contribuyen al mantenimiento de a unidad epitelial es determinante para permitir la migración de una célula epitelial cancerosa. En la interacción homotípica célula-célula de una masa tumoral la *cadherina-E* es la molécula de adhesión intercelular que más ha sido estudiada, sobretodo en el proceso metastático. Se ha observado que en muchos carcinomas humanos disminuye o se pierde la expresión o función de esta molécula. Éste es un cambio temprano en la progresión metastásica (Birchmeier y Behrens, 1994) que facilita además que las células tumorales se liberen de los controles de adhesión de las células vecinas. Esto les permite separarse de la masa tumoral primaria y quedar libres para migrar (Johnson, 2000).

MOTILIDAD E INVASIÓN

Una vez desprendidas de la masa tumoral, las células metastásicas tienen que establecer contactos temporales con componentes de la matriz extracelular (MEC), lo cual se realiza a través de CAMs donde las integrinas juegan un papel predominante (Jin y Varner, 2004).

Para poder migrar, las células tumorales inician un proceso de polarización y formación de protuberancias en la membrana, a las cuales se les conoce como pseudópodos o lamelipodios. Las integrinas fijan las protuberancias a la MEC interactuando con el citoesqueleto de actina y activando la asociación de diversas moléculas de señalización. Se generan entonces, fuerzas que jalan parte de la célula hacia delante. Subsecuentemente, se lleva a cabo una contracción que va acompañada por la separación de las CAMs y sus ligandos en la matriz extracelular en la parte posterior (o urópodo) de la célula, resultando en un desplazamiento neto de la célula hacia el frente (Brakebusch *et al*, 2002 y Sheetz *et al*, 1999).

Durante el proceso de invasión, las células tumorales tienen que cruzar la matriz intersticial que está compuesta de proteoglicanos, glicoproteínas y proteínas fibrilares compuestas por diversos tipos de colágenas. Se ha observado que muchos tumores tienen altos niveles de actividad proteolítica, por lo que se piensa que la degradación de la MEC es un prerequisite para que un tumor invada exitosamente el tejido que le rodea (Crawford y Matrisian, 1994). Las proteasas que participan en la invasión y la metástasis pertenecen a cuatro grupos: metaloproteinasas de matriz (MPMs), proteinasas de serinas, de cisteínas y de aspartato; siendo las más estudiadas las MPMs dentro de las cuales la MPM-2 y MPM-9 juegan un papel importante en la degradación de la MEC para la invasión (Ray y Stetler-Stevenson, 1994).

EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE

Desde que las células se tornan cancerosas y una vez que logran alcanzar el torrente sanguíneo o linfático, dependen de una exitosa evasión del sistema inmune, ya que éste es capaz de detectar y destruir a las células transformadas. Existe un número cada vez mayor de reportes que resaltan la función antitumoral del sistema inmune, y el papel activo que juega en la supresión del crecimiento de tumores tempranos.

Lang y colaboradores (2006) proponen seis mecanismos de escape característicos de las células tumorales. Estos incluyen la alteración de la maquinaria procesadora

de antígenos (MPA), factores solubles inmunosupresores (FSIS), microvesículas y exosomas derivadas del tumor, contra-ataque tumoral, fusión celular y desarrollo de la metástasis.

Dentro de la maquinaria procesadora de antígenos, la presentación de antígenos vía moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) es crucial durante para una respuesta inmune adecuada. Las alteraciones en el procesamiento y presentación de antígenos es un mecanismo usado comúnmente por los virus para evadir el sistema inmune del hospedero. De manera similar, la pérdida o regulación negativa de moléculas de clase I del CMH es un mecanismo frecuentemente utilizado por los tumores para escapar del reconocimiento y destrucción por parte de los linfocitos T citotóxicos (CTLs).

Otro mecanismo de escape tumoral es el uso de factores solubles inmunosupresores. Estos factores se han hallado en ratones experimentales a los que se les han inducido tumores y en pacientes con potencial inmune disminuido por presencia de cáncer. Aparentemente, las respuestas deficientes del sistema inmune en dichos pacientes se atribuyen a la secreción de citocinas inmunosupresoras, como la interleucina-10 y TGF β (factor de crecimiento transformante beta). La primera es una citocina que regula la diferenciación, maduración y estado funcional de las células dendríticas. La segunda es una molécula que inhibe la activación, proliferación y actividad de los linfocitos T. El TGF β se encuentra frecuentemente en altos niveles en tumores malignos y se asocia tanto con un mal pronóstico como con la pérdida de la respuesta del tumor a la inmunoterapia.

Desde hace más de 25 años se describió la habilidad de los tumores para liberar o cubrirse de vesículas de membrana (VM) o exosomas. Existen estudios donde se ha encontrado en común el antígeno asociado a tumores FasL en microvesículas presentes en fluidos corporales de pacientes con cáncer colorectal, tumores de ovario o carcinoma de células orales. FasL induce apoptosis de células T activas lo cual puede jugar un papel significativo en la eliminación del componente más efectivo de la respuesta antitumoral, las células T. Provee además una explicación

a la apoptosis espontánea de estas células en circulación periférica de pacientes con cáncer.

FasL también está involucrado en el contra-ataque tumoral. La expresión de esta molécula por parte de los tumores implica que las células cancerosas son así mismo resistentes a la muerte celular inducida por FasL. Existen evidencias que sugieren que la expresión de esta molécula es relevante para la progresión tumoral y la formación de metástasis. Algunos estudios muestran que la expresión de FasL está asociada con metástasis a nodos linfáticos. Estos hallazgos indican la participación de dicha molécula en la evasión inmune, progresión tumoral y metástasis desarrollada al promover la sobrevivencia de las células tumorales en sitios hostiles inmunológicamente, así como por la inducción de apoptosis en las células normales vecinas al tumor, lo cual facilita la invasión de las células tumorales (CT) (Lang *et al*, 2006).

El concepto de fusión celular no es nuevo, pero ha resurgido bajo los aspectos de iniciación y desarrollo del cáncer. Los conceptos que se discuten incluyen la iniciación del cáncer por transformación de células troncales (SC, de stem cells) y la fusión de éstas con las células tumorales. Las SC pueden ser atraídas hacia el tejido tumoral por señales inflamatorias o de regeneración de tejido. Las SC derivadas de la médula ósea son móviles y no residentes, tienen una baja restricción tisular y sobreviven en ambientes asociados a un tejido sano como en ambientes asociados a un estado patológico. Después de fusionarse con otras células, las SC les transfieren algunas de sus características, lo cual puede promover un estado de des-diferenciación, incluyendo un incremento en la proliferación, sobrevivencia, invasión y evasión inmune. Las células neoplásicas pueden adquirir además otras características del sistema inmune tal como la capacidad de migración activa y quimiotaxis. Por lo tanto, la fusión celular es un mecanismo celular para el cambio de fenotipo y función, que bien puede resultar en una aceleración de la progresión del cáncer.

El desplazamiento físico y dispersión a diversos tejidos del cuerpo por parte de las células de un tumor primario puede, en ocasiones, haber superado un estado de

latencia antes del desarrollo de una masa tumoral secundaria. Aún no está claro cómo se inicia el proceso metastático pero hasta el momento se han sugerido tres teorías. Una de ellas postula que el potencial metastático de un tumor se basa en alteraciones genéticas en la tumorigénesis temprana. Otra de las hipótesis afirma que los factores interno-ambientales tales como citocinas y neurotransmisores funcionan como iniciadores de la actividad migratoria de las CT, de manera similar a la regulación de la migración leucocitaria. La tercera hipótesis sugiere que las CT adquieren su potencial migratorio a partir de la fusión con células troncales de origen mieloide. Donde la fusión o las alteraciones genéticas son quienes proveen a la célula tumoral del fenotipo migratorio, mientras que los factores interno-ambientales son los últimos iniciadores de la actividad metastásica (Lang *et al*, 2006).

PARO Y EXTRAVASACIÓN

La mayor parte de las células metastásicas (CM) circulantes son detenidas por restricción de tamaño. Los vasos capilares son angostos (3-8 μm de diámetro) y están diseñados para permitir el paso de glóbulos rojos y leucocitos –los cuales son de 7 μm de diámetro en promedio además de que son altamente flexibles– mientras que muchas células cancerosas sobrepasan esta capacidad pues tienen un diámetro de 20 μm o más. Las células blancas de la sangre, mucho más pequeñas que las células cancerosas, son arrastradas por el flujo sanguíneo a través de los capilares o de las vénulas y pueden ser frecuentemente detenidas en las paredes de los vasos (Chambers *et al*, 2002). En los años 50's se observó actividad procoagulante y fibrinolítica en extractos de tumores humanos. Veinte años después se demostró que la agregación de células tumorales circulantes con plaquetas y linfocitos, así como su adhesión al endotelio vascular actúa de manera determinante en la sobrevivencia de las células cancerosas. Además, las plaquetas activadas son una fuente de prostaglandinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PGF) y agentes que incrementan la permeabilidad vascular, lo cual puede contribuir a la extravasación de las CM.

El arresto de las células tumorales en la micro-vasculatura de su órgano blanco se relaciona frecuentemente con cambios en el mismo endotelio vascular, lo que permite que ocurra la penetración de las paredes de los vasos, primero por parte de los leucocitos y posteriormente por parte de las CM (Weiss, 2000a). Este tipo de interacción adherente mediado por CAMs ha sido bien descrito, sin embargo, las CM usualmente no son detenidas de esta forma cuando son inyectadas en ratones normales. Las CM pueden detenerse por adhesión en los vasos pre-capilares del hígado (vénulas portales) cuando el endotelio ha sido activado por citocinas. La extravasación de CM no necesariamente ocurre en los sitios que, por características físicas, detienen un amplio número de células circulantes; sino que el fenómeno de extravasación responde también a una interacción célula tumoral-célula endotelial que permitirá o no el paso de las CM. La extravasación se presentará también si las CM encuentran las condiciones apropiadas en el órgano a invadir, esto es, la regulación del crecimiento de un nuevo tumor dependerá también de las interacciones moleculares entre las células tumorales y el microambiente del tejido u órgano donde se desarrolla la metástasis (Chambers *et al*, 2002).

ESTABLECIMIENTO DE LA METÁSTASIS

Estudios previos indican que los factores moleculares presentes en los diversos órganos pueden influenciar el desarrollo de las células tumorales (CT). Dichos estudios mencionan que igualmente las CT responden de distintas formas –en términos de expresión de genes, habilidad de desarrollo y respuesta a terapias– dependiendo del ambiente que encuentren en el nuevo órgano. Por ejemplo, las células de cáncer de mama y de próstata que llegan al tejido óseo reciben un estímulo de crecimiento muy eficiente, esto es debido a una interacción molecular recíproca que ocurre entre las células cancerosas y los osteoblastos u osteoclastos. Moléculas tales como la proteína relacionada a la hormona paratiroidea y el TGF β que pueden ser producidas por las CT o estar presentes en el microambiente del tejido óseo, que normalmente actúan como mediadores del desarrollo óseo. La

expresión del receptor para el EGF ayuda a las células de cáncer de colon, entre otras, a desarrollarse en el hígado. Por ello se ha asociado a este factor con la expresión de otros factores de crecimiento en el tejido hepático como el TGF α .

Recientes estudios en genes supresores de metástasis son consistentes con la idea de que la regulación del crecimiento en un sitio secundario es una característica crucial de la habilidad metastásica. De hecho, se han identificado genes que tienen un efecto funcional en la regulación de la capacidad para iniciar y mantener el crecimiento celular después de que las CM llegan al sitio secundario. La capacidad metastásica de los tumores mamarios en estudios con ratones se ha asociado a variaciones alélicas en uno de estos genes supresores de metástasis, el BRMS1.

Estudios acerca de la contribución de receptores a citocinas en metástasis órgano-específicas aportan importantes claves acerca del porqué algunos cánceres realizan metástasis a órganos específicos. Se conoce que las citocinas y sus receptores desempeñan un papel importante en el establecimiento de linfocitos y células hematopoyéticas a órganos específicos. En algunos trabajos, se ha mostrado que las CT expresan patrones de receptores a citocinas que se ajustan al tipo de citocinas expresadas en sus órganos blanco. Por ejemplo, tanto las células de cáncer de mama como los tumores primarios del mismo, expresan altos niveles de las citocinas CXCR4 y CCR7. Los ligandos específicos para estos receptores – CXCL12 y CCL21– respectivamente, se encuentran en concentraciones elevadas en los nodos linfáticos, pulmones, hígado y médula ósea; órganos a los cuales los tumores de mama frecuentemente realizan metástasis. Más aún, bloqueando CXCR4, se encontró una inhibición de la metástasis de cáncer de mama en modelos de animales experimentales (Chambers *et al*, 2002).

ANGIOGÉNESIS

Una de las interacciones más importantes de los tumores con el hospedero es la que forma con el endotelio vascular, permitiendo el desarrollo de nuevos vasos que irrigen al tumor mediante un proceso conocido como neovascularización o

angiogénesis. Sin neovascularización, el crecimiento de un tumor primario o de uno metastásico se encuentra severamente limitado (Weiss, 2000b).

El proceso de angiogénesis se refiere principalmente a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. Todas las células endoteliales (CEs) de los vasos sanguíneos se encuentran alineadas de tal manera que puedan proliferar para formar nuevos vasos, migrar hacia blancos distantes y sobrevivir a procesos de desgaste y senescencia. Por su parte, el microambiente del hospedero puede dirigir señales a las CEs para que se multipliquen y eviten la apoptosis. La adquisición de un fenotipo móvil, las modificaciones del acoplamiento entre las células endoteliales y la matriz extracelular, la formación de estructuras tubulares y la resistencia a los procesos de muerte programada, definen en conjunto los múltiples pasos del proceso de angiogénesis. La ejecución exitosa de estos procesos depende de un delicado balance de los factores promotores e inhibidores de crecimiento que rodean al endotelio. Y aunque una amplia variedad de factores de crecimiento y citocinas actúan como inductores de la angiogénesis, el VEGF se ha identificado como el principal factor de crecimiento específico para el endotelio vascular.

La angiogénesis participa de manera esencial en diversos procesos normales como el desarrollo embrionario, ciclo menstrual y reparación de lesiones. Sin embargo, la angiogénesis se ha observado en forma des-regulada en algunas condiciones patológicas como neuropatía, psoriasis, cáncer y retinopatía. Esta des-regulación generalmente es la causa de un crecimiento excesivo y de los vasos, lo cual tiene un significativo impacto en la salud, contribuyendo también al desarrollo de otras enfermedades como artritis reumatoide, obesidad y enfermedades infecciosas.

En el caso de los tumores, su progresión y metástasis son dependientes de la angiogénesis. Después de la transformación inicial, las CT sufren cambios genéticos que resultan en la selección de clones dominantes con diversas características metastásicas y de crecimiento que les confieren ciertas ventajas sobre otras células. Se establece además una interacción activa entre los tumores y los vasos sanguíneos. Los estudios han mostrado que los tumores no pueden

crecer más allá de 1 ó 2 mm sin un aporte adecuado de nutrientes a través de un sistema vascular adecuado. Este proceso es conocido actualmente como activación angiogénica. En este aspecto, los estudios actuales se inclinan a una mejor comprensión de los fenómenos que ocurren durante la neovascularización tales como la hipoxia, el balance microambiental y pro-angiogénico del tumor, incremento de los factores y citocinas que promueven el crecimiento de nuevos vasos, disminución de factores antiangiogénicos y secreción de MPM. Los mecanismos propuestos más recientemente sugieren que además de las CEs pre-existentes, las células precursoras hematopoyéticas y endoteliales derivadas de la médula pueden movilizarse e incorporarse en los vasos tumorales formados *de novo* (vasculogénesis), proceso que hasta ahora se pensaba restringido al desarrollo embrionario (Gupta y Zhang, 2005).

BIOLOGÍA DEL ENDOTELIO

Como se ha mencionado en los párrafos anteriores, las células endoteliales participan en forma importante en el control de la función vascular. A partir de los años 80's, se incrementó el conocimiento sobre su estructura, así como acerca de sus propiedades funcionales; ya que la monocapa endotelial puede ser una membrana pasiva, o bien, transformarse en un complejo tejido con funciones especializadas y capaz de adaptarse y responder a las necesidades específicas según la localización y condiciones de su microambiente (Michiels, 2003).

Las células endoteliales (CEs) forman monocapas celulares que recubren la luz de los vasos sanguíneos y linfáticos y son de hecho un epitelio modificado, poseen una estructura típica ya que su morfología se asemeja a un empedrado; siendo la excepción el endotelio alto de las vénulas de órganos linfoides, las cuales muestran una especializada morfología cúbica o los endotelios discontinuos o fenestrados del hígado y de algunas glándulas neuroendócrinas donde la sangre hace contacto directo con las membranas apicales de los tejidos. Las CEs se caracterizan por la presencia de diversos marcadores biológicos como los receptores de LDL o los cuerpos de Weibel-Palade. Estos últimos con forma de bastones contienen a la

proteína del factor von Willebrand (específica del endotelio), el factor VIII de la cascada de coagulación, la selectina-P y algunas quimiocinas como la interleucina-8 (IL-8) que, posteriormente, pueden ser secretadas o expuestas en la membrana apical en respuesta a citocinas inflamatorias. La presencia de la enzima convertidora de angiotensina y la captación de LDL son otras propiedades que las identifican. La organización estructural de estas células es crucial para sus funciones en el tráfico de células y moléculas. A nivel microscópico ciertos órganos (como la médula ósea) tienen una cubierta endotelial fenestrada, mientras que, a nivel molecular, las uniones célula-célula tienen una estructura peculiar de organización. Se han descrito los cuatro tipos de uniones celulares formando parte de la monocapa endotelial: uniones estrechas (tight junctions), de adherencia (gap junctions), comunicantes y desmosomas. Las uniones estrechas son más comunes en las arterias que en las venas y las uniones tipo gap no se encuentran en los capilares (Mantovani *et al*, 2001).

En procesos como la inflamación y la coagulación, los leucocitos circulantes que deben infiltrarse en los tejidos necesitan migrar a través de las uniones intercelulares. Una de las características típicas de las uniones endoteliales es su organización dinámica, ya que las CEs son capaces de cambiar rápidamente la arquitectura de sus uniones para permitir el paso de las células sanguíneas circulantes. Este fenómeno, en la mayoría de los casos es rápidamente reversible, o sea que, el endotelio es capaz de desorganizar y reorganizar sus uniones intercelulares en minutos. Esto explica en parte porqué, comparada con otras monocapas epiteliales, la monocapa endotelial es de baja resistencia eléctrica y relativamente permeable.

Las uniones inter-endoteliales presentan distintos grados de complejidad a lo largo del árbol vascular, respondiendo a los diferentes requerimientos funcionales. Así, se encuentran en gran número y altamente organizadas en arterias de mayor calibre o en la vasculatura que irriga el cerebro, donde el control de la permeabilidad debe ser estricto. Mientras que, poseen una organización primitiva en las vénulas postcapilares, donde la extravasación y el intercambio de

componentes del plasma con el espacio intersticial deben ser más eficientes (Injune *et al*, 2001).

En personas adultas, el estado fisiológico de las CEs es muy similar al estado que presentan al llegar a confluencia *in vitro*. En esta condición, el crecimiento celular se inhibe por contacto, la monocapa se protege de la apoptosis y existe un total control de la permeabilidad. Por el contrario, cuando las CEs están creciendo, como en caso de la angiogénesis, su comportamiento es comparable al de las células sub-confluentes y dispersas *in vitro*, esto es, las CEs pueden elongarse, ser estimuladas por factores de crecimiento y adquieren una elevada capacidad móvil (Dejana, 2004).

Los avances en biología vascular han permitido entender la etiología de muchas enfermedades vasculares como la inflamación, la angiogénesis patológica o la arterioesclerosis; y a su vez abren las puertas para la investigación y desarrollo de tratamientos contra estas enfermedades, ya sea para su prevención o para evitar su progresión. A su vez, también ha permitido el desarrollo de fármacos antiangiogénicos para inhibir el crecimiento de tumores.

Las CEs son en conjunto el mayor regulador de la homeostasis vascular, pues forma una barrera selectiva para el transporte de moléculas entre la sangre y los tejidos. La monocapa endotelial representa una superficie amplia para el intercambio de material, interactuando con las células circulantes por un lado, y, por otro, con otras células presentes en la pared vascular o células del músculo liso. Además, las CEs, al formar la interfase entre la sangre y los tejidos, son muy susceptibles a los cambios en la composición y flujo sanguíneos. Al ser el endotelio el mayor efector de respuestas a casi cualquier cambio en los parámetros sanguíneos tiene la capacidad de pasar –temporalmente- de un estado en reposo anti-trombótico y no adhesivo a ser una superficie en condiciones aptas para la adhesión celular, coagulación, inflamación y vasoconstricción (Michiels, 2003).

FENOTIPO CONSTITUTIVO DEL ENDOTELIO

El endotelio en un adulto normal -aunque se encuentra metabólicamente activo basal-, se considera en estado quiescente o de reposo asociado a un recambio muy lento de las CE. Las CEs quiescentes forman una población heterogénea que varía no sólo entre órganos sino dentro de vasos de distintos calibres dentro de un mismo órgano. La heterogeneidad en la estructura de estas células ejemplifica su capacidad de adaptación al microambiente y a la función del vaso (Risau, 1995). De manera intrínseca, las CEs en reposo constituyen una superficie no trombogénica y no adherente, en la cual se expresan o liberan en forma limitada algunas CAMs, receptores para factores de crecimiento y óxido nítrico (NO) (López-Bojórquez *et al*, 2004). En general, las CEs primarias en reposo exhiben cierto número de características moleculares específicas que las definen como tipo celular. Entre estas características se encuentran la expresión del factor o proteína de von Willebrand (vWF) que se mencionó con anterioridad, las moléculas de adhesión ICAM-1 y PECAM-1, el VEGF y los receptores para éste Flt-1 y KDR (Unger *et al*, 2002) (Figura 3). Existen líneas celulares derivadas de angiosarcomas, que pueden ser consideradas como células tumorales de origen endotelial, en las cuales no se han observado diferencias en los niveles de expresión de las moléculas mencionadas. Los mismos marcadores se encuentran en las CEs obtenidas de vena umbilical humana (HUVECs) que son actualmente, uno de los modelos más ampliamente utilizados para el estudio de eventos inflamatorios y metastáticos (Krump-Konvalinkova *et al*, 2003).

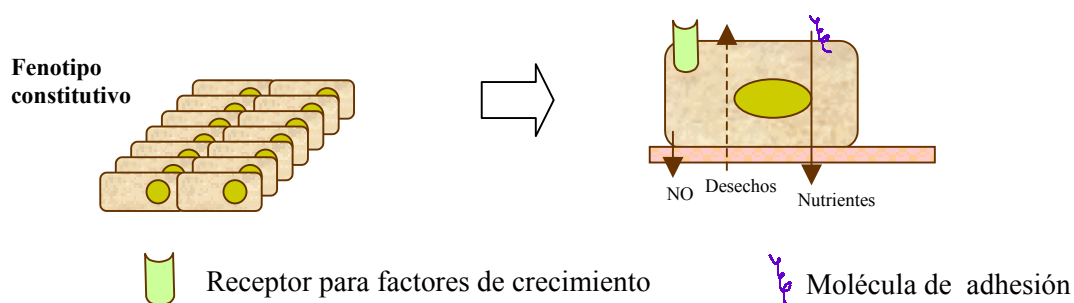


Figura 3. Esquema de parte de una monocapa endotelial en el estado constitutivo, y una vista de cerca a la célula endotelial en dicho estado, en la cual existe un flujo normal de desechos, nutrientes, óxido nítrico y una baja expresión de moléculas de adhesión.

FENOTIPO ACTIVADO DEL ENDOTELIO

Las CEs se consideran activadas si se encuentran proliferando o se tornan adhesivas para las células sanguíneas (Risau, 1995). Por su localización estratégica entre la sangre y los tejidos, las CEs están sometidas a una exposición constante a mediadores circulantes y pueden por ello responder rápidamente a sustancias agonistas tales como la histamina o la trombina liberados por plaquetas. De igual manera, la exposición de CEs a citocinas conduce a profundas alteraciones en sus funciones que involucran la expresión de genes y síntesis de proteínas. Esta reprogramación funcional de las CEs ha sido referida también como activación endotelial (Remich y Friedland, 1997).

La mayoría de los datos publicados sobre la modulación de CEs resalta el papel de las citocinas, de éstas, las más conocidas que actúan sobre las CEs tanto *in vivo* como *in vitro* son la Interleucina-1 beta (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y los interferones (IFN). Pero existen también algunos trabajos de los efectos biológicos que provocan otras citocinas como la IL-2, IL-4, IL-6 y el TGF β (Pober y Cotran, 1990). Otro mediador que puede causar la activación de las CEs es el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina. Este compuesto bacteriano se encuentra implicado en la patogénesis de diversas disfunciones de las CEs asociadas a enfermedades, y puede presentarse también en pacientes que han sufrido una intervención quirúrgica, pues pese a los avances en terapia antimicrobiana y todos los cuidados médicos, la sepsis por bacterias Gram-negativas continúa siendo común. Todos estos mediadores y citocinas, incluyendo al LPS, actúan a través de la activación de receptores específicos presentes en la membrana apical de la célula endotelial (CE) (Bannerman y Goldblum, 2003).

En respuesta a los estímulos activadores, prácticamente todos los subtipos de CEs presentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que caracterizan al estado activado. El hecho de que la activación se caracterice por cambios en los patrones de expresión génica para adaptar a la célula a los nuevos requerimientos locales no representa un proceso de diferenciación como tal, ya que todos los cambios que sufre la CE son reversibles (Goepfert *et al*, 2000).

Las CEs no sólo son activadas por citocinas y quimiocinas, sino que también pueden sintetizarlas y secretarlas cuando cambian al fenotipo activado. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 son parte del repertorio de citocinas inflamatorias producidas por el endotelio. Éstas pueden actuar tanto de modo autócrino como parácrino y permitir así, la amplificación y difusión de la respuesta (Toborek y Hennig, 1996). Las quimiocinas endoteliales incluyen miembros de las familias CXC (IL-8 , IP10 y $\text{gro}\alpha$) y CC (MCP-1 , MCP-3 y RANTES). Algunas de ellas permiten una respuesta quimiotáctica localizada necesaria en la migración de CEs que tiene lugar durante la angiogénesis (Cummings *et al*, 1999).

Factores de coagulación, moléculas glicosiladas, receptores para factores de crecimiento, radicales libres y CAMs son parte también del fenotipo activado del endotelio (Figura 4). Pero es relevante mencionar que la CE también sufre cambios en el arreglo del citoesqueleto, lo cual la capacita para la transmigración leucocítica que sigue a la adhesión. Estudios inmunocitoquímicos señalan que existe una reorganización de los filamentos de actina, especialmente aquellos asociados a las uniones célula-célula (Moldovan *et al*, 2000).

La activación endotelial está involucrada en procesos como la inflamación crónica y aguda, regulación del tono vascular, cascada de coagulación, trombosis y angiogénesis. En dichos procesos, la CE tiene la capacidad de producir moléculas de muy distinta naturaleza, cuya síntesis y expresión dependerá del estímulo y entorno al que las CEs estén expuestas (Kumar *et al*, 1999).

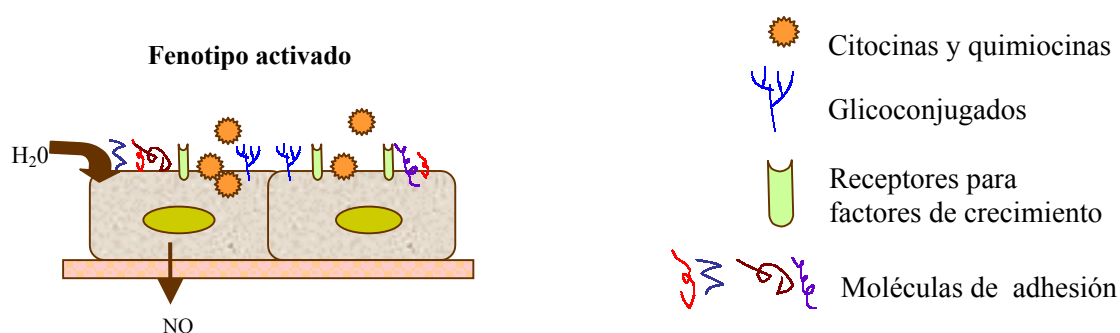


Figura 4. Representación esquematizada de la elevada expresión de receptores para factores de crecimiento y moléculas de adhesión en el fenotipo activado de las células endoteliales. Se muestra además la liberación de citocinas y entrada de agua en las CEs cuando éstas son activadas por citocinas.

INFLAMACIÓN, ENDOTELIO Y CÁNCER

La inflamación es un proceso fisiológico que inicia como respuesta al daño causado por infección con agentes patógenos (por el reconocimiento de PAMPs a través de receptores de la familia Toll), irritaciones químicas, traumatismo mecánico, radiación o reacciones de tipo antígeno anticuerpo. El proceso inflamatorio involucra una serie de eventos entre los que se incluyen la dilatación de arterias, venas y/o capilares, los cuales, a su vez, sufren un incremento en la permeabilidad, liberación de fluidos y proteínas plasmáticas. Si la inflamación aguda persiste, ésta puede desarrollarse en un proceso crónico, siendo capaz entonces de producir, algunas veces, un daño aún mayor que el agente productor (Gabay y Kushner, 1999).

En las etapas tempranas de la inflamación, los neutrófilos son las primeras células en migrar al sitio inflamatorio bajo la regulación de moléculas rápidamente producidas por macrófagos y mastocitos reclutados en el tejido. Mientras la inflamación progresa, varios tipos de leucocitos, linfocitos y otras células inflamatorias son activadas y atraídas hacia el sitio inflamado por una red de señales que involucran un gran número de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas (Lu *et al*, 2006). Para fijarse al endotelio activado y extravasarse hacia los tejidos, los neutrófilos deben reconocer a las CEs activadas y adherirse a ellas con la firmeza suficiente para evitar que el flujo sanguíneo los arrastre. A continuación, estos leucocitos adheridos deben penetrar la monocapa endotelial y migrar hacia el tejido subyacente. Monocitos y eosinófilos se extravasan durante una fase tardía de la respuesta inflamatoria por un proceso semejante, pero las etapas se conocen con más claridad en el caso de los neutrófilos.

El proceso de extravasación de los neutrófilos puede dividirse en cuatro etapas secuenciales: 1) rodamiento, 2) activación por el estímulo quimioatrayente, 3) paro y adherencia y 4) migración trans-endotelial. En la primera etapa los neutrófilos se adhieren en forma laxa al endotelio por interacción de baja afinidad entre selectina y carbohidrato. Las moléculas de la familia de selectinas son expresadas por el endotelio en respuesta a las citocinas y otros mediadores que actúan en la

reacción inflamatoria. Estas selectinas, principalmente E y P, se fijan a moléculas de adherencia similares a mucina que se presentan sobre la membrana del neutrófilo, o a un lactosaminoglicano sialilado conocido como sialilo de Lewis X. Esta interacción enclava al neutrófilo por poco tiempo en la célula endotelial, pero la fuerza de fricción de la sangre circulante acaba por desplazarlo de este sitio. Las moléculas de selectina situadas sobre otra célula endotelial hacen lo mismo con el neutrófilo. Este proceso se repite de modo que el neutrófilo salta una y otra vez a lo largo del endotelio, por lo que a esta primera etapa de interacción se le conoce como "rolling" o rodamiento.

Conforme el neutrófilo rueda, lo activan diversos estímulos quimioatrayentes; entre los cuales se encuentran quimiocinas como la IL-8 y la proteína inflamatoria de los macrófagos (MIP-1 β), factores como el PAF (factor activador de plaquetas), productos del desdoblamiento del complemento (C5A, C3A y C5b67) y diversos péptidos N-formilo producidos por el desdoblamiento de proteínas bacterianas durante una infección. La fijación de estos quimioatrayentes a los receptores situados sobre la membrana del neutrófilo desencadena una señal activadora mediada por proteínas G relacionadas. Esta señal induce un cambio de conformación en las moléculas de integrina de la membrana del neutrófilo, lo que aumenta su afinidad por las moléculas de adherencia de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) en el endotelio. La interacción subsecuente entre las integrinas del neutrófilo y las CAMs endoteliales de la superfamilia de Ig (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1 y MAdCAM-1) estabiliza la adherencia del neutrófilo a la CE y le permite que se adhiera con firmeza a ésta.

Posteriormente, el neutrófilo migra a través de la pared vascular hacia los tejidos. Las etapas de la migración trans-endotelial y la manera en que ésta se dirige aún no han sido completamente esclarecidas; pero es posible que sean mediadas por la activación ulterior causada por los factores quimioatrayentes e interacciones subsecuentes entre integrinas y CAMs. Cabe mencionar la relevancia que tiene la capacidad móvil y producción de proteasas por parte del neutrófilo, como características que bien pueden formar parte de las herramientas necesarias para

la transmigración. Una vez en los tejidos, los neutrófilos, seguidos por monocitos y linfocitos, son atraídos hacia los agentes patógenos por quimiotaxis, lo cual favorece su fagocitosis (Goldsby *et al*, 2004).

Sin embargo, ¿cómo es que la inflamación crónica puede promover un proceso canceroso? La inflamación crónica, como ya se mencionó, se caracteriza por la constante presencia de daño tisular, proliferación celular inducida por el daño y los procesos participantes en la reparación. La proliferación celular en este contexto comúnmente se relaciona con la *metaplasia*, un cambio reversible en el tipo celular. A la metaplasia le sigue la *displasia* que se refiere a un desorden en la proliferación celular que permite la producción de células atípicas. La displasia es considerada como un evento previo de los carcinomas, ya que usualmente se le encuentra en sitios adyacentes a las neoplasias. El control o reparación del daño causante de la inflamación involucra moléculas que tienen propiedades pro- y anti-inflamatorias como la prostaglandina E₂, el TGFβ, especies reactivas de oxígeno (ROS) e intermediarios nitrogenados. Sin embargo, si la resolución de la inflamación no es regulada, la respuesta celular se torna a un patrón de inflamación crónica, en la cual, la poza celular es dominada por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos con morfología variada. Durante el proceso inflamatorio los macrófagos y las CEs generan una gran cantidad de factores de crecimiento, citocinas, ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) que pueden causar daño al ADN. Tanto macrófagos como linfocitos T liberan TNFα y factor inhibidor de la migración de macrófagos los cuales incrementan el daño causado previamente al ADN. Además, el segundo es capaz de afectar la respuesta protectora dependiente de p53 causando la acumulación de mutaciones oncogénicas. Si los macrófagos y el endotelio permanecen activados, pueden permitir que el daño tisular continúe y por tanto, la inflamación crónica predispone a una neoplasia.

La angiogénesis y la infiltración de células inmunes se han asociado también a eventos inflamatorios y carcinógenos. Por una parte, el ambiente inflamatorio que rodea a un tumor puede favorecer el rompimiento de la membrana basal, un proceso requerido para la invasión y migración de células tumorales. Además, las

células tumorales pueden producir citocinas y quimiocinas para atraer células inmunes y facilitar tanto la evasión del mismo sistema inmune, como su establecimiento y desarrollo, revisado previamente. Por otra parte, el incremento de macrófagos asociados a un tumor (TAM) se asocia a un mal pronóstico, ya que éste contribuye al desarrollo del tumor a través de diversos mecanismos. Uno de ellos es la liberación, por parte de los TAM, de IL-10 y prostaglandina E₂ los cuales suprimen la respuesta antitumoral. Otro es la facilidad que tienen los TAM de liberar factores angiogénicos como VEGF, EGF, endotelina-2 y activador de plasminógeno que promueven el crecimiento tumoral. Los TAM también pueden facilitar la invasión de las células tumorales al liberar metaloproteinasas de matriz e inducir la producción de TNF α y la enzima iNOS (Lu *et al*, 2006). Es interesante notar que, en el caso de cáncer de glándula mamaria, una de las enfermedades con peor pronóstico es la que se asocia a una inflamación crónica.

PRINCIPALES MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN EN LA RELACIÓN INFLAMACIÓN-CÁNCER

A pesar de los avances de los últimos años para entender la contribución de moléculas específicas y las rutas de señalización en el efecto promotor de tumores que tiene la inflamación, se hace cada vez más importante no sólo comprender la participación de estas moléculas, sino también las interacciones celulares que juegan un papel relevante en estos procesos (Mueller, 2006). A continuación se describen algunas de las principales moléculas que participan en la progresión de la inflamación al cáncer.

Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa multifuncional así como un radical libre altamente reactivo. Es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, NADPH y oxígeno por la enzima sintasa de óxido nítrico (NOS), de la cual existen tres isoformas: neuronal, inducible y endotelial (nNOS, iNOS y eNOS, respectivamente). Como una molécula de señalización, el NO regula diversos procesos fisiopatológicos relacionados con la función vascular, neurológica y citotóxica. De

forma muy interesante, varios estudios han demostrado que el NO puede promover e inhibir la progresión tumoral y la metástasis. Los efectos del NO en los tumores son dependientes de la actividad y localización de las isoformas de la NOS, la concentración, el tiempo de exposición y la sensibilidad celular al NO.

La transformación neoplásica es un paso clave inicial en el desarrollo del cáncer. La inflamación crónica y la continua exposición a concentraciones -moderadas a altas- de NO producido por la iNOS se consideran eventos promotores de la transformación neoplásica. El NO y los reactivos derivados de éste inducen estrés oxidativo, el cual resulta en daño al ADN e inhibición de las enzimas que lo reparan a través de mecanismos directos e indirectos.

La iNOS puede ser expresada por diversas células tumorales humanas. Existen evidencias clínicas de que el NO derivado de tumores puede promover e inhibir la progresión de los mismos dependiendo del contexto fisiológico en que se presente. Exámenes histológicos han revelado una correlación entre una alta actividad angiogénica o elevada expresión de VEGF con la expresión de iNOS en tumores de colon, estómago, mama, cuello y cerebro, entre otros. Estos hallazgos indican que el NO derivado de células tumorales es mediador de la angiogénesis, invasión y crecimiento del tumor (Fukumura *et al*, 2006) (Figura 5).

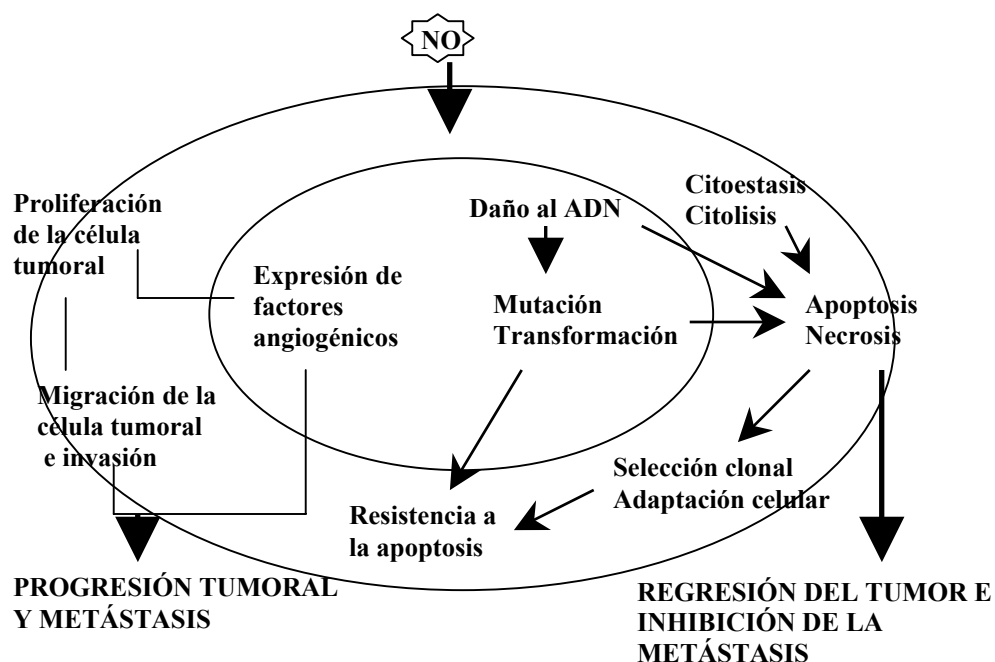


Figura 5. Mecanismos de acción del NO en células tumorales. El NO puede inducir la progresión y metástasis de manera directa por incremento en la proliferación, migración e invasión; e indirectamente mediante la expresión de factores angiogénicos. La inhibición de los mismos procesos mediante muerte celular es producto del daño en el ADN causado por el efecto citotóxico del NO, el cual resulta en la regresión del tumor e inhibición de la metástasis (Tomado de Fukumura *et al*, 2006).

Quimiocinas

Actualmente, se ha demostrado que diversos miembros de las citocinas quimioatrayentes –más conocidas como quimiocinas– y sus receptores, participan de manera importante en pasos críticos de la tumorigénesis y/o metástasis. Las funciones de las quimiocinas se han detallado en los leucocitos, ya que éstos usan estas proteínas para detenerse en los vasos sanguíneos inflamados y como guía hacia sitios específicos de inflamación. Las quimiocinas representan un amplio grupo de pequeñas proteínas quimioatrayentes (8-11 KDa) clasificadas en cuatro familias (C, CC, CXC y CX₃C). Las quimiocinas interactúan también con receptores de superficie, cuyos miembros son parte de la gran familia de receptores acoplados a proteínas G. *In vivo*, la activación de integrinas dependiente de quimiocinas resulta en una detención firme de leucocitos en la superficie luminal

de los vasos sanguíneos, principalmente para la diapedésis de estas células en los tejidos inflamados (Kakinuma y Hwang, 2006). Las quimiocinas son producidas por las CEs en respuesta a moléculas involucradas en la reacción inflamatoria, inmunidad y trombosis. Los inductores de quimiocinas incluyen citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-4, IL-13, IL-17, TNF, productos bacterianos, LDL ligeramente modificadas, trombina, fibrina, histamina e incluso la hipoxia. La quimiocina IP10 por ejemplo, se expresa en ciertos tipos de endotelio murino expuesto a IFN γ o LPS *in vivo* y actúa sobre células T y monocitos pero no en neutrófilos. Sin embargo, no se tienen estudios de su expresión en CEs *in vitro*. Por otro lado, RANTES ha sido inducido *in vitro* en CE expuestas a IFN γ o a TNF (Mantovani *et al*, 1997).

Citocinas

Las CEs son tanto una fuente como un blanco para las citocinas. Estos polipéptidos solubles son mediadores que sirven como señales de comunicación de las CEs con los leucocitos y con diversos órganos o tejidos. El panorama de respuestas emitidas por el endotelio a las diferentes citocinas es extremadamente vasto y variado, ya que las distintas citocinas actúan de forma característica sobre diversas funciones que pueden agruparse en programas de activación y/o diferenciación (Mantovani y Garlanda, 2001). Las citocinas no siempre son secretadas, en algunos casos pueden ser expresadas en la superficie de células estimuladas. Sin embargo, sean secretadas o expresadas de manera superficial, las citocinas tienen un modo de acción común: se unen a su proteína receptora específica sobre la superficie de la célula blanco. Las citocinas no tienen actividad enzimática o reactividad química pero funcionan indirectamente alterando algunas de estas funciones en sus células blanco. En este sentido, las citocinas son similares a las hormonas. El blanco celular para las citocinas puede ser la misma célula que la origina (acción autócrina), las células cercanas (acción parácrina) o, como en el caso de las hormonas, las células blanco pueden estar muy distantes, incluso encontrarse en otros órganos (acción endócrina). Existen dos características

generales en las funciones de las citocinas: primero, una citocina frecuentemente causa la secreción de una segunda citocina por su célula blanco y así sucesivamente. Este fenómeno se ha descrito como cascada de citocinas. Segundo, las citocinas individuales frecuentemente modulan la acción de otras citocinas en la misma célula blanco. Tales interacciones pueden ser mutuamente inhibitorias, aditivas, sinérgicas o resultar en efectos novedosos que no ocurrirían por causa de ninguna de las citocinas individuales. Entre las citocinas que tienen acciones específicas sobre las CEs cobran relevancia las interleucinas (IL-) 1, 2, 4, 6 y 8, el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), el interferón gamma ($\text{IFN}\gamma$) y el factor de crecimiento transformante beta ($\text{TGF}\beta$) (Pober y Cotran, 1990).

El factor de necrosis tumoral alfa

El $\text{TNF}\alpha$ fue aislado en 1975 a partir del suero de ratones sometidos a tratamiento con endotoxina bacteriana. En la actualidad es ampliamente conocido que esta molécula induce necrosis, pero este efecto está restringido a un grupo limitado de tipos tumorales, de donde deriva su nombre. Sin embargo, es interesante notar que el $\text{TNF}\alpha$ no induce apoptosis en ninguna célula primaria normal.

El $\text{TNF}\alpha$ es una proteína de 157 aminoácidos, 17 KDa y está conformada como heterotrímero en solución. Su bioactividad es principalmente regulada por los receptores de unión a $\text{TNF}\alpha$ soluble. El $\text{TNF}\alpha$ es además, una citocina pro-inflamatoria derivada principalmente de fagocitos mononucleares, linfocitos T y células NK (Natural Killer). Se expresa en bajas cantidades en otras células como fibroblastos, células de músculo liso y células tumorales. En dichas células, el $\text{TNF}\alpha$ es sintetizado como pro-TNF (26 KDa) y permanece en la membrana hasta ser liberado por escisión mediante una endopeptidasa de membrana denominada enzima convertidora de TNF. El blanco principal del $\text{TNF}\alpha$ son las CEs, por lo que se emplea como el principal activador endotelial en experimentos *in vitro*. Se ha documentado que el $\text{TNF}\alpha$ es capaz de inducir la activación de las CEs cambiando los niveles de expresión de algunas proteínas de membrana, lo que a su vez puede ocasionar cambios en su morfología y motilidad (Pober, 2002 y Van Horsen *et al*,

2006). La expresión de nuevas proteínas por parte de las CEs activadas con $\text{TNF}\alpha$ puede regular otros parámetros de la respuesta inflamatoria tales como la vasoregulación (por ejemplo, por acción de COX-2 y ciclohidrolasa de GTP, entre otras), adhesión leucocitaria (por efecto de selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1), activación de leucocitos (por quimiocinas tales como IL-8 y MCP-1) y coagulación (a través del Factor tisular y PAI-1) (Madge y Pober, 2001).

El $\text{TNF}\alpha$ actúa por vía de dos distintos receptores. Sin embargo, aunque la afinidad por el receptor 2 a TNF (TNFR-2) es cinco veces más alta que para el TNFR-1, éste último es quien inicia la mayoría de las actividades biológicas del $\text{TNF}\alpha$. El TNFR-1 se expresa en todos los tipos celulares, mientras que la expresión del TNFR-2 se restringe a las células del sistema inmune. La diferencia más importante entre ambos receptores es un dominio de muerte (DD) en TNFR-1, ausente en TNFR-2. Una razón por la que el TNFR-1 es un miembro importante de la familia de receptores de muerte, es que cuenta con la capacidad dual de inducir muerte celular apoptótica a través de una cascada de caspasas y de transducir señales de sobrevivencia celular a través del sistema NF- κ B (Van Horssen *et al*, 2006). Probablemente la respuesta más importante requerida para que la célula endotelial deje el estado de reposo e inicie la expresión de genes del fenotipo activado, es la inducida por TNF mediante la activación del NF- κ B (Madge y Pober, 2001).

LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL NF- κ B

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es un factor de transcripción primordial en la regulación de los genes de respuesta temprana involucrados en la interacción célula-célula, comunicación intercelular, reclutamiento o trans migración, amplificación de señales patogénicas y en la aceleración de la tumorigénesis. Actualmente se han identificado cinco miembros de la familia NF- κ B en mamíferos, estos incluyen: NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB y c-Rel. Todos ellos comparten un dominio de homología Rel altamente conservado, el cual es responsable de la unión al ADN, dimerización e interacción con los inhibidores intracelulares de NF- κ B (I κ Bs).

La expresión de genes de respuesta temprana mediada por miembros de la familia de factores de transcripción NF- κ B es inducida por una amplia gama de señales. Entre éstas se incluyen citocinas, mitógenos, partículas ambientales, metales tóxicos, estrés intracelular, productos virales o bacterianos y luz UV (Figura 6).

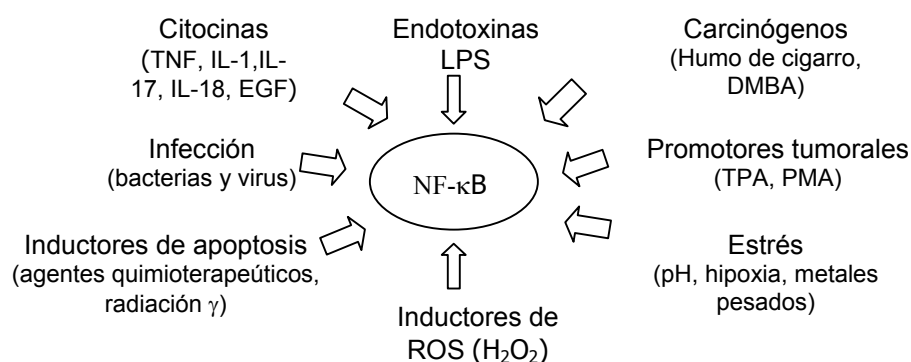


Figura 6. Activación de la cascada de señalización del NF- κ B por agentes inflamatorios (Tomado de Aggarwal, 2004).

En las células en reposo, el NF- κ B se encuentra secuestrado en forma inactiva en el citoplasma a través de su asociación con una de varias moléculas inhibitoras (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , p105 y p100). De las proteínas inhibitoras de NF- κ B, I κ B α es la más abundante. Sin embargo, todas las proteínas I κ B contienen dos residuos conservados de serina (Ser 32 y Ser 36) en su dominio N-terminal. La fosforilación de estos residuos, en respuesta a los inductores, permite la inmediata poliubiquitinación de la proteína I κ B por el complejo SCF- β -TrCP que actúa como ubiquitin-transferasa tipo 3. Esta modificación convierte a la proteína en un blanco para la rápida degradación por parte de la subunidad 26 S del proteosoma. La degradación de los I κ Bs puede ser completa o parcial, como el procesamiento del carboxilo terminal en p105 y p100. La degradación del inhibidor permite la liberación y translocación del NF- κ B al núcleo, donde éste se une a secuencias específicas en regiones reguladoras del ADN (designados como elementos κ B) (Figura 7).

La unión a los elementos κ B resulta en la activación de la transcripción de genes mediadores de la inflamación, carcinogénesis y reacciones pro- o antiapoptóticas. Para algunas formas de NF- κ B como el heterodímero p50/p50 también se ha reportado un efecto inhibitorio de la transcripción (Chen *et al*, 2001) (Figura 8).

Activación del sistema NF- κ B

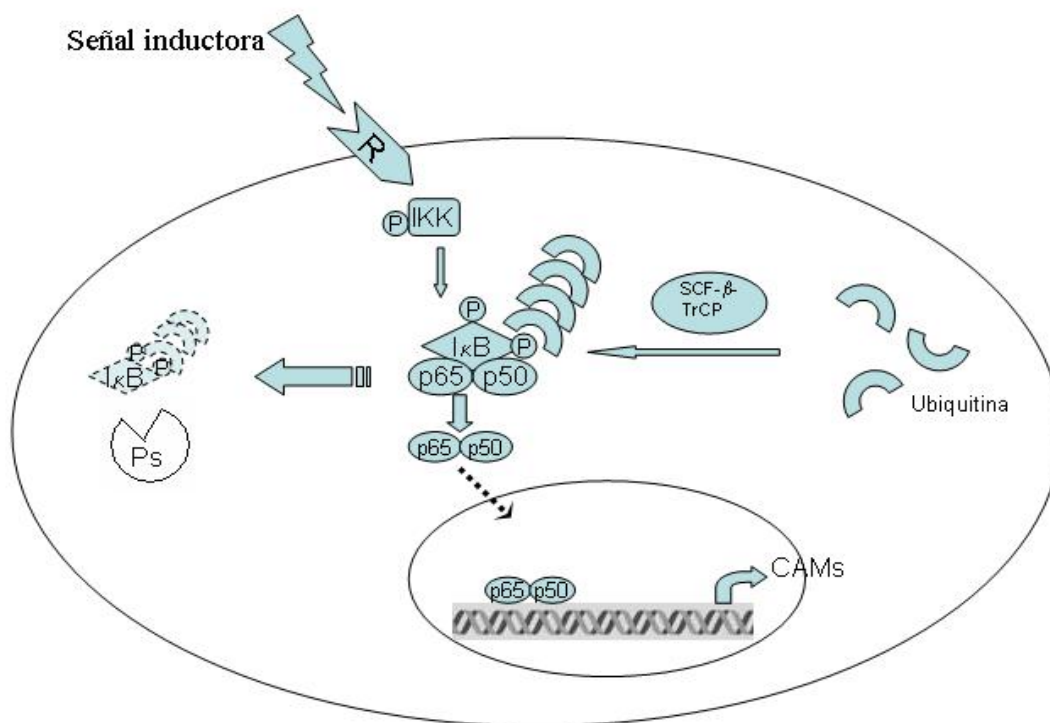


Figura 7. La activación del sistema NF- κ B requiere una señal inductora que llega a su receptor específico. Se conocen al menos tres receptores que reconocen distintos ligandos: citocinas, factores de crecimiento y productos virales o bacterianos. La unión del ligando a su receptor (**R**) activa a la cinasa del inhibidor I κ B (**IKK**). IKK fosforila entonces al inhibidor I κ B haciéndolo susceptible de la adición de moléculas de ubiquitina, función que es realizada por el complejo de ubiquitinación **SCF-B-TrCP**. Una vez que ha sido fosforilado y ubiquitinado el inhibidor I κ B que mantiene secuestrado al heterodímero NF- κ B (**p65-p50**) en el citoplasma, es reconocido y degradado por el proteosoma (**Ps**). Esto libera al heterodímero NF- κ B para que pueda ser translocado al núcleo celular, donde se une a secuencias específicas en el ADN para iniciar la transcripción de genes que codifican para moléculas de adhesión (**CAMs**), entre muchas otras.

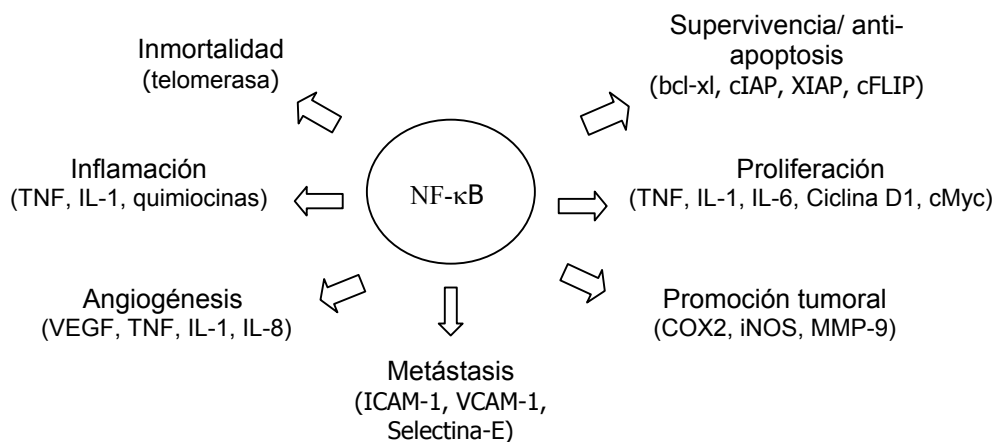


Figura 8. La expresión de numerosos genes involucrados en diversos procesos es regulada por la activación de NF- κ B (Tomado de Aggarwal, 2004).

FAMILIAS DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Durante la embriogénesis, control de la homeostasis, inflamación, invasión y metástasis, las CAMs juegan un papel central. El interés en las CAMs se ha incrementado en los últimos años gracias al papel que desempeñan en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Este interés se ve reforzado por su intervención como reguladores en la transducción de señales, que impacta en la regulación y diferenciación celular (Rosales *et al*, 1995). A continuación se describen algunas de las características y funciones de las cuatro familias principales de moléculas de adhesión.

INTEGRINAS

Las integrinas son moléculas receptoras de adhesión que se expresan de manera ubicua. Son esenciales para el anclaje y control de la migración celular, progresión del ciclo celular y en la muerte celular programada, respuestas que regulan en sinergia con otras vías de transducción de señales.

Este amplio grupo de proteínas transmembranales está formado por 18 subunidades α y 8 subunidades β , las cuales dimerizan no covalentemente para formar al menos 24 diferentes heterodímeros. Cada uno con distintas propiedades de unión a ligando y señalización. Esta variedad de heterodímeros y la redundancia

con la que se unen a elementos de la MEC ha dificultado entender sus funciones específicas.

Con su dominio extracelular, las integrinas pueden unirse a diversas moléculas de la MEC, tales como colagenasa, o a receptores celulares como VCAM-1. Su dominio intracelular se une directamente al citoesqueleto de actina, uniendo entonces el citoesqueleto a la MEC. Las integrinas funcionan también como receptores de señalización bidireccional. Inducen cambios en la actividad proteica o en la expresión de genes en respuesta a la unión con su ligando y modulan la afinidad adhesiva de la superficie celular en respuesta a cambios fisiológicos en la célula (Brakebusch *et al*, 2002).

Como se mencionó anteriormente, las integrinas median la adhesión celular a las proteínas de la MEC, algunas, de manera selectiva. Por ejemplo, la integrina $\alpha 5\beta 1$ reconoce fibronectina principalmente, mientras que otras pueden unirse a diversos ligandos. La integrina $\alpha v\beta 3$ se une a vitronectina, fibronectina, fibrinógeno y colágena entre otros componentes de matriz extracelular. Algunas reconocen al tripéptido Arg-Gly-Asp como la integrina $\alpha IIb\beta 3$, y otras más, reconocen pequeñas secuencias peptídicas como las integrinas $\alpha 4\beta 1$. Además, las integrinas también son capaces de transducir señales intracelulares que promueven la migración celular. Las integrinas no poseen una actividad enzimática intrínseca, sin embargo, pueden iniciar vías de señalización relacionadas con cinasas y proteínas adaptadoras en los complejos de adhesión focal (Jin y Varner, 2004). Así, las integrinas facilitan el desplazamiento celular a través del tejido mediante la activación de enzimas degradadoras de matriz extracelular.

CADHERINAS

La familia de las cadherinas integra receptores de adhesión dependientes de calcio que generalmente participan en adhesiones homotípicas célula-célula. Las cadherinas se clasifican en dos subgrupos basados en su asociación con los componentes del citoesqueleto. El primer grupo integra las cadherinas N, P y E. Estas moléculas se localizan en las uniones adherentes y pueden formar anclajes

con el citoesqueleto de actina. El segundo grupo comprende cadherinas asociadas a los desmosomas y forman uniones con los elementos intermedios.

La estructura típica de una cadherina consiste de un dominio externo amino-terminal que contiene 5 repeticiones en tándem, un segmento sencillo transmembranal y un dominio citoplásmico carboxi-terminal de casi 150 aminoácidos. La capacidad de unión de las cadherinas se localiza en las repeticiones en tándem del extremo amino, mientras que las otras repeticiones contienen los sitios de unión a calcio. El dominio citoplásmico interactúa fuertemente con un grupo de proteínas intracelulares conocido como cateninas, que sirven como intermediarias de la unión cadherinas-microfilamentos de actina y median mecanismos de transducción de señales que regulan el crecimiento y diferenciación celular asociados a la β catenina.

Las cadherinas tienen un papel crítico en la determinación de la organización tisular. Son especialmente importantes en algunas fases de la morfogénesis durante el desarrollo, pero en organismos adultos, la pérdida de la expresión de estas moléculas en tumores epiteliales se encuentra asociada con un fenotipo más invasivo y maligno. En tumores de mama altamente invasivos, la cadherina-N reemplaza a la cadherina-E de los contactos célula-célula. Por ello se ha propuesto que la cadherina-N es un mediador de la interacción de células del carcinoma con las células estromales mamarias. Esto sugiere también que la cadherina-N está involucrada en la promoción de la metástasis del cáncer de mama por facilitar la migración de las células tumorales a través del estroma mamario y en el re-establecimiento de la adhesión homofílica en la metástasis (Okegawa *et al*, 2004 y Rosales *et al*, 1995).

SELECTINAS

Las selectinas constituyen una familia de moléculas de adhesión celular que se unen a carbohidratos. Hasta el momento se han encontrado tres selectinas asociadas a la superficie celular: selectina-L (CD62L), selectina-P (CD62P) y selectina-E (CD62E). Todas ellas comparten una estructura similar compuesta de

un dominio extracelular de lectina tipo C dependiente de calcio en su región N-terminal, un dominio similar al factor de crecimiento epidermal y un número variable de consensos repetidos con secuencias similares a las proteínas reguladoras del complemento. Adicionalmente, las selectinas poseen una región transmembranal seguida por un pequeño dominio citoplásmico (Figura 9).

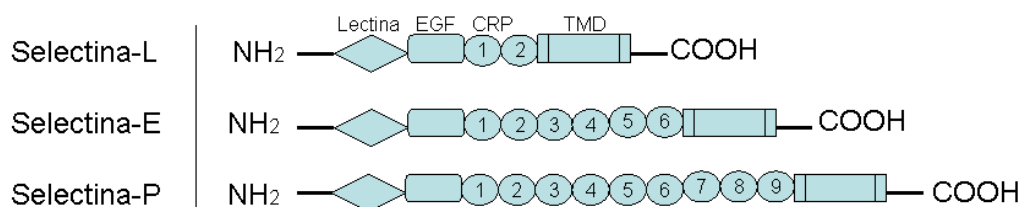


Figura 9. Cada una de las selectinas está constituida por un dominio de lectina (Lectina) en el extremo N-terminal, un dominio semejante al factor de crecimiento epidermal (EGF), un número variable de dominios semejantes a las proteínas reguladoras del complemento (CRP), un dominio transmembranal (TMD) y un pequeño dominio citoplásmico.

La expresión de cada una de las selectinas, se encuentra limitada a distintos tipos celulares. Así, la selectina-L es propia de las células hematopoyéticas, pues se expresa constitutivamente en la mayoría de las células B, timocitos y células T, pero no sobre las células T de memoria. Esta misma se expresa también durante la diferenciación mieloide y está presente en la mayoría de neutrófilos y monocitos maduros. La selectina-P se encuentra permanentemente en los cuerpos de Weibel-Palade de las CE y gránulos de las plaquetas, pero se moviliza rápidamente a la superficie celular al activarse la respuesta inflamatoria. Esta expresión superficial es transitoria y se revierte en pocos minutos. Por su parte, la inducción de la expresión de selectina-E requiere la síntesis *de novo* tanto de ARNm como de la misma proteína (Tedder, 1995).

Las formas solubles de las selectinas pueden ser detectadas en plasma, por lo que la alteración de sus niveles en plasma ha sido asociada a enfermedades. La importancia fisiológica de la adhesión mediada por selectinas está claramente demostrada en el síndrome clínico llamado deficiencia de adhesión leucocitaria tipo-II (LAD-II). LAD II resulta de un defecto en la síntesis de carbohidratos fucosilados, los cuales incluyen a los ligandos de selectina E y P. Dado que las

selectinas contienen dominios homólogos para lectinas tipo C, el análisis de la unión a su ligando se ha enfocado principalmente al reconocimiento de los carbohidratos reconocidos por este dominio. Aunque la estructura detallada de sus ligandos no ha sido determinada, se conoce que los tres tipos de selectina pueden unir a la molécula sialyl Lewis (sLe X y sLe A). En forma general, las selectinas tienen su función en los pasos iniciales del reclutamiento leucocitario a los sitios de inflamación, el cual inicia en los vasos pocos minutos después del daño tisular. Numerosos estudios indican que estas interacciones son, en primer lugar, mediadas por selectinas (Tedder, 1995).

Selectina-E

La selectina-E, también llamada ELAM-1 o CD62E es uno de los tres miembros identificados en la familia de las selectinas. Su dominio extracelular N-terminal de tipo lectina, reconoce como ligandos a carbohidratos del tipo oligosacárido sialyl Lewis y lactosaminoglicanos. En su conjunto, el peso molecular aproximado es de 64 KDa, aunque se han caracterizado formas de 107-115 KDa según el grado de glicosilación que haya adquirido la molécula en su forma madura. Su expresión *de novo* en CEs activadas por IL-1 β , LPS o TNF α es un pre-requisito para la activación de células inmunes mediante mediadores inflamatorios. Esta expresión es máxima entre las 2-4 h posteriores a la activación. Transcurridas 24-48 h la selectina-E es liberada a la circulación en forma soluble. Esta molécula posee efectos quimiotácticos sobre neutrófilos y una función activadora sobre las integrinas de la familia β 2. Durante la primera fase de la reacción inflamatoria la selectina-E es mediadora de la adhesión laxa y rodamiento ("rolling") de leucocitos y neutrófilos sobre el endotelio vascular. Se han encontrado niveles elevados de ésta molécula en pacientes con enfermedades autoinmunes (Madhavan *et al*, 2002).

Existen dos vías que pueden ser responsables de la expresión de selectina-E. Aunque es más conocida la expresión de esta molécula debido a la activación del factor nuclear NF- κ B inducida por TNF α , se ha determinado que la secuencia consenso que reconoce el factor nuclear κ B es idéntico a un sitio funcional en otro

promotor, cJUN. Los mismos activadores que actúan para NF- κ B (además de la luz UV), funcionan sobre MAP cinasas constitutivas del núcleo (Read *et al*, 1997).

SUPERFAMILIA DE INMUNOGLOBULINAS

Los miembros que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, son moléculas de adhesión independientes de calcio que se componen de 4-6 unidades repetidas semejantes a inmunoglobulinas (Ig-like) en el dominio de unión a su ligando. Presentan hasta 5 unidades repetidas semejantes a fibronectina en sus dominios extracelular, transmembranal e intracelular. El dominio con unidades semejantes a Ig se compone de 70-100 residuos de aminoácidos que se organizan en dos cadenas β antiparalelas. En la mayoría de los casos, estas cadenas son estabilizadas por enlaces disulfuro. Aunque la estructura terciaria de los dominios es muy similar entre los diferentes miembros de la superfamilia, la estructura primaria es altamente variable. Existen cerca de cien miembros en esta superfamilia, y algunos de ellos (ICAM-1, 2, 3; LFA-2, 3; NCAM, PECAM-1 y VCAM-1) participan en la adhesión celular (Okegawa *et al*, 2002).

VCAM-1

La molécula de adhesión de células vasculares-1, también conocida como CD106, está presente en células dendríticas, macrófagos, fibroblastos de médula ósea, mioblastos y miotúbulos. Su función biológica es favorecer la adhesión de linfocitos, monocitos, células NK, eosinófilos y basófilos al endotelio a través de la interacción con su contra-receptor leucocitario, la integrina VLA-4. Produce además una adherencia firme de formas no neutrofílicas circulantes a la monocapa endotelial. En cultivos de CEs la forma predominante es la 7D VCAM-1. En su estructura encontramos un núcleo (también denominado "core") de aproximadamente 81 KDa con sitios de N-glicosilación. La forma madura tiene un peso molecular aproximado de 110 KDa. Aunque no es constitutiva en el endotelio, VCAM-1 puede ser regulada positivamente *in vitro* en respuesta a citocinas tales como LPS, TNF α , IL-1 β , IFN γ e IL-4.

La expresión máxima se encuentra entre 6-12 h posteriores al estímulo, mientras que la declinación en la concentración de esta molécula ocurre una vez cumplidas 48 h, que corresponde a la fase tardía de la reacción inflamatoria.

La forma soluble se encuentra presente en el suero de individuos sanos, pero sus niveles están aumentados en diversas enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, esclerosis sistémica, lupus eritematoso y artritis reumatoide. Se ha demostrado también una concentración incrementada de VCAM-1 en suero de pacientes con diversos tipos de cáncer (Madhavan *et al*, 2002 y Simiantonaki *et al*, 2002).

ICAM-1

También llamada CD54, pertenece al igual que VCAM-1 a la superfamilia de las inmunoglobulinas. ICAM-1 es una proteína de cadena sencilla con un peso molecular entre 80 y 114 KDa. Posee cinco dominios extracelulares similares a las inmunoglobulinas. ICAM-1 es capaz de ligar contra-receptores de la familia de las integrinas. Se expresa de forma constitutiva en el endotelio vascular, en el epitelio tímico, en fibroblastos y en macrófagos principalmente. Puede ser regulada positivamente en el endotelio y en fibroblastos por la presencia de IL-1 β , TNF α e IFN γ . De este modo participa en diferentes etapas de la adhesión firme leucocito-endotelio y en la migración trans-endotelial. También actúa en la activación de linfocitos T. Su mayor expresión se presenta a las 6-8 h posteriores al estímulo y su declinación a las 48 h.

Su forma soluble se encuentra elevada respecto a sus valores normales en diversas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico o la diabetes tipo I. A ICAM-1 se le considera como un posible mediador de la adhesión homotípica entre células tumorales (Madhavan *et al*, 2002 y Simiantonaki *et al*, 2002).

Inflamación y desarrollo del cáncer

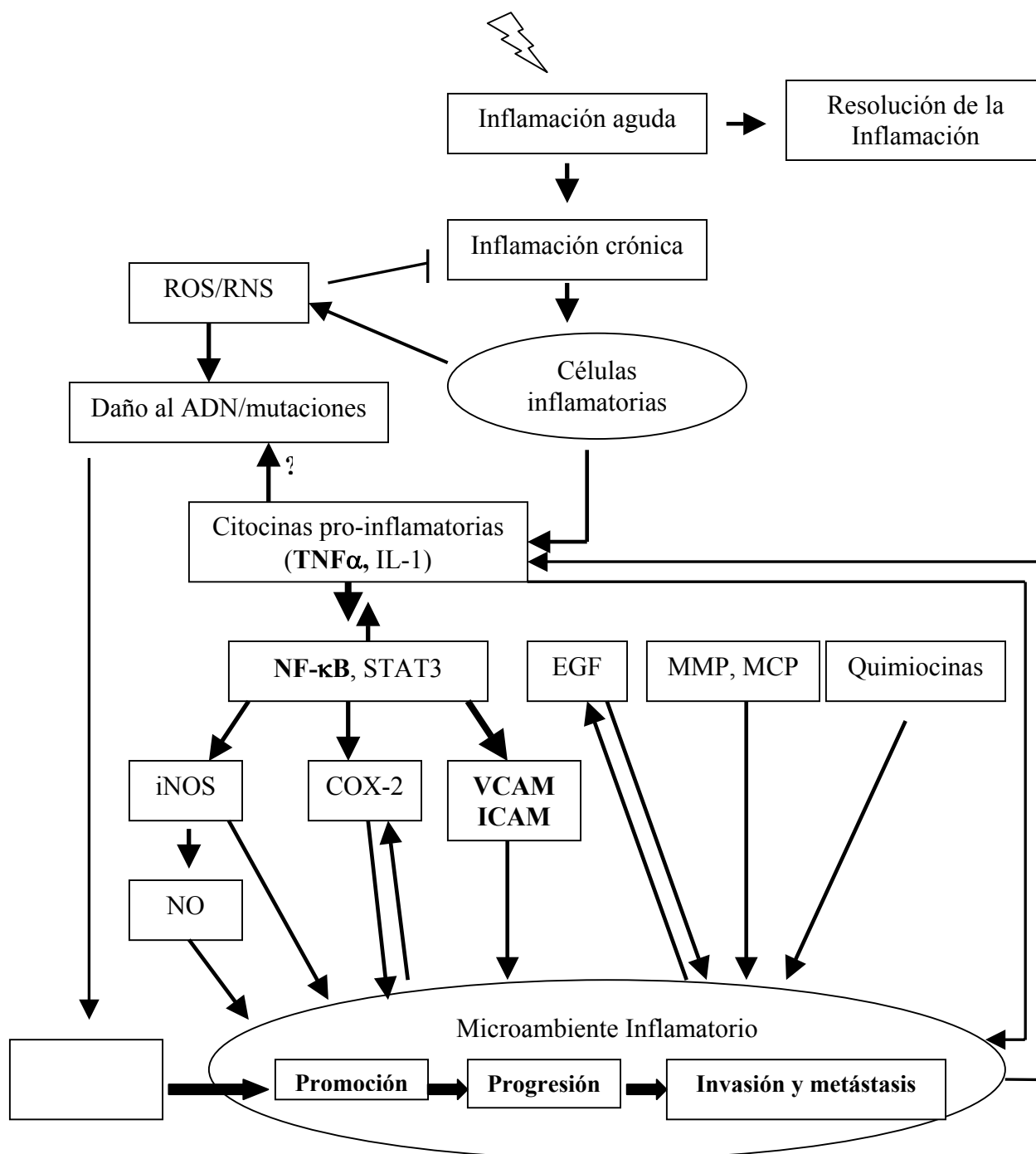


Figura 10. Diagrama de los mecanismos que relacionan a la inflamación con el desarrollo del cáncer. La promoción de un tumor es el proceso en el cual las células iniciadas desarrollan lesiones benignas. La progresión se refiere al proceso mediante el cual los tumores benignos progresan hacia un carcinoma maligno (Modificado de Lu *et al*, 2006). Las moléculas y flechas en negritas son aquellas cuyo efecto o expresión sobre las células endoteliales ha sido evaluado en el presente trabajo.

EL CÁNCER DE GLÁNDULA MAMARIA Y SUS FACTORES DE RIESGO

En México, el cáncer de glándula mamaria, mama o seno (que son los nombres con que se le llama de forma indistinta) es actualmente la neoplasia de mayor incidencia, específicamente en los estados del norte y el Distrito Federal (AMLC). A nivel mundial representa la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres y se estima que el número de nuevos casos de cáncer de glándula mamaria en el mundo se acerca a un millón al año (Informe 2002 de la Organización Mundial de la Salud, WHO).

El cáncer de mama es una enfermedad compleja que involucra una gran variedad de factores de riesgo en su etiología y desarrollo. Estudios epidemiológicos realizados en distintas poblaciones han establecido una serie de factores de riesgo para el desarrollo de este padecimiento, los cuales se citan en la siguiente tabla.

Principales factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de glándula mamaria
Edad
Ubicación geográfica
Estatus socio-económico
Eventos reproductivos (menarca o menstruación, menopausia, embarazos)
hormonas exógenas (terapia de reemplazo hormonal (HRT) y uso de anticonceptivos orales)
Estilo de vida (dieta, consumo de alcohol, obesidad y actividad física)
Historial de enfermedades de mama benignas
Exposición a radiación ionizante
Densidad ósea, densidad mamográfica, niveles de IGF-1 y prolactina
Factores genéticos (genes de susceptibilidad a cáncer de mama de alta y baja penetrancia)

En cuanto a la edad, por ejemplo, la incidencia de cáncer de mama es muy baja antes de los 25 años (<10 nuevos casos por 100,000 mujeres), y se incrementa hasta cien veces en mujeres que superan los 45 años. Esto a su vez, se relaciona con los eventos reproductivos y tiempo de exposición a hormonas sexuales, ya que es importante la edad de la primer menarca, el primer embarazo llegado a

término, el número de éstos, la duración de la lactancia y la edad en que se presenta la menopausia. Una menarca temprana (antes de los doce años de edad) se asocia a un incremento en el riesgo de cáncer de mama; probablemente debido a la exposición prolongada de los epitelios ductal y lobulillar del seno a estrógenos y progesterona propios del ciclo regular ovulatorio. De forma similar, un retraso en la menopausia implica un mayor número de ciclos ovulatorios y por tanto, propicia el incremento de riesgo para cáncer de mama. En contraste, una menopausia inducida quirúrgicamente (ovariectomía o histerectomía) antes de los 35 años resulta en la disminución del riesgo. La elevada actividad proliferativa de las células de los epitelios ductal y lobulillar confiere a la glándula mamaria una alta susceptibilidad de ser alterada por carcinógenos químicos. Después de la menopausia, los niveles de hormonas ováricas se reducen, lo cual se correlaciona con un decremento en la proliferación de los epitelios mamarios.

Si tomamos el caso de las hormonas, el uso de éstas después de la menopausia en esquema de reemplazo hormonal incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama en forma dependiente de la duración de la exposición o de si los estrógenos se usaron solos o en combinación con progestinas.

Por su parte, la relación entre el uso de anticonceptivos orales y el riesgo de tener cáncer de mama ha sido ampliamente estudiada por diversos grupos. El efecto más importante se observó en usuarias comunes de estos anticonceptivos, en quienes se incrementó en un 24% el riesgo de desarrollar cáncer de glándula mamaria y un descenso del mismo después de suspender el tratamiento. Además, el uso de anticonceptivos orales a una edad temprana, especialmente antes de los 20 años de edad, resulta en un aumento en el riesgo de padecer cáncer de mama. Entre los factores relacionados con el estilo de vida, el consumo de alcohol ha sido reconocido por numerosos estudios epidemiológicos como un importante factor de riesgo para este cáncer en mujeres pre- y post-menopáusicas. El riesgo se incrementa en forma lineal de manera dosis-dependiente hasta una ingesta de 60 g (2-5 copas)/día, pero por cada 10 g (1 copa) de incremento en el consumo diario de alcohol, el riesgo de desarrollar cáncer de glándula mamaria se incrementa en

un 9%. Aunque no se comprende el mecanismo por el cual el alcohol puede causar cáncer de mama, la principal línea de investigación se basa en que el alcohol puede actuar indirectamente a través de su primer metabolito, el acetaldehído, un mutágeno y carcinógeno muy bien caracterizado, que puede actuar como promotor tumoral o bien, permitir la activación de procarcinógenos.

La dieta humana contiene una amplia variedad de carcinógenos químicos y naturales. Algunos de estos compuestos pueden generar ROS, las cuales causan daños en el ADN. Una elevada ingesta de grasas, especialmente ácidos grasos insaturados, se asocia al incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de glándula mamaria, mientras que un tipo particular de ácidos grasos poli-insaturados, conocidos como omega-3, ha mostrado un efecto protector contra el cáncer de mama. El consumo de frutas y vegetales, que constituyen una rica fuente de antioxidantes, ha mostrado en diversos estudios contribuir a la disminución del riesgo de padecer diversos tipos de cáncer, en particular el de glándula mamaria.

En muchas ocasiones, las características genéticas predisponen a padecer ciertas enfermedades. En el caso del cáncer de glándula mamaria, mutaciones en los genes de alta penetrancia o susceptibilidad al cáncer, tales como BRCA1 y BRCA2, p53, PTEN, ATM, NBS1 o LKB1, son responsables de una alta proporción de los cánceres de mama hereditarios. Varios polimorfismos en genes de baja penetrancia como CYP1A1, CYP2D6, CYP19, GSTM1, GSTP1, ADH1C, MTHFR, XRCC1 y XRCC3 entre otros, se asocian tanto al incremento como a la disminución de riesgo de padecer cáncer de mama (Dumitrescu y Cotarla, 2005).

El ritmo de vida de los últimos años, ha traído como consecuencia, el cambio de hábitos de salud en las mujeres mexicanas, quienes han incrementado el consumo de alcohol y tabaco. Y han denunciado un mayor número de malestares asociados a estrés. Todos ellos, eventos relacionados con el desarrollo de diversas formas de cáncer.

¿Qué tanto sabemos actualmente del cáncer de mama? Esta es una pregunta hasta hoy difícil de responder; sin embargo, es clara la necesidad de identificar su fenotipo, así como las características genéticas y moleculares que expliquen las

causas de esta enfermedad para entenderla e incrementar con ello las oportunidades de desarrollar o mejorar métodos para su prevención, detección y tratamiento.

ANTECEDENTES

EL PROCESO METASTÁSICO APROVECHA ELEMENTOS DE LA INFLAMACIÓN

Se estima que más del 20% de las formas malignas del cáncer son iniciadas o aceleradas por un proceso inflamatorio. Y, aunque las bases moleculares sobre estos procesos a la fecha no han sido clarificadas del todo, estudios recientes han sugerido la participación de los mecanismos de señalización intracelular de citocinas como el $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ e IL-6. Los factores de transcripción a los que activan dichas citocinas: NF- κ B, STAT1 y STAT3 respectivamente, han mostrado tener la participación más importante en la transmisión de la señal inflamatoria de las citocinas al núcleo. De particular interés es el sistema NF- κ B, que en las células tumorales promueve el crecimiento y sobrevivencia a través de la inducción de genes blanco, cuyos productos promueven la división celular e inhibición de la apoptosis (Yoshimura, 2006).

Mientras que la inflamación aguda forma parte de la respuesta de defensa de un organismo, la inflamación crónica puede desembocar en cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares, pulmonares y neurológicas. Diversos productos de genes pro-inflamatorios como $\text{TNF}\alpha$ y miembros de esta superfamilia, interleucinas como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-18; quimiocinas, la metaloproteinasa de matriz-9, el VEGF y la ciclooxigenasa-2, han sido identificados como mediadores en procesos como supresión de la apoptosis, proliferación, angiogénesis, invasión y metástasis (Aggarwal *et al*, 2006).

Estudios realizados por Brener y Krause (1995 y 1999 respectivamente) muestran que las moléculas de adhesión están involucradas no solamente en la inflamación sino también en la metástasis tumoral. Al parecer, para adherirse al tejido blanco, los tumores aprovechan elementos de la respuesta inflamatoria pues se ha observado la presencia de células inflamatorias rodeando al tumor y produciendo citocinas como el $\text{TNF}\alpha$ o IL-1 β entre otras.

La presencia de citocinas producidas por las células del sistema inmune es capaz de activar al endotelio, provocando en ellas la expresión de diversas moléculas de adhesión (Remich y Friedland, 1997). Estas citocinas inflamatorias son potentes moduladores de una amplia variedad de funciones endoteliales relevantes para la hemostasis y trombosis e incluso algunas han sido implicadas como mediadores de neoplasia y sepsis (Schleef *et al*, 1988). Por tanto, en muchos casos el desarrollo de un cáncer maligno se asocia con un proceso inflamatorio (Yoshimura *et al*, 2006) debido a la frecuente presencia de células y producción de citocinas inflamatorias en regiones circundantes al tumor (Apte *et al*, 2006).

Estudios previos han demostrado que la selectina-E media la unión de neutrófilos y algunas líneas celulares de leucemia (HL60 y U937) a células endoteliales, pero que esta misma molécula no participa en la adhesión de linfocitos o líneas celulares linfocíticas. Se ha encontrado también que la adhesión de monocitos humanos a HUVECs estimuladas con la citocina $TNF\alpha$, es mediada por selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1; y que el bloqueo con anticuerpos específicos contra estas moléculas reduce significativamente la adhesión (Carlos *et al*, 1991).

Tanto en el endotelio vascular tumoral como en células del huésped que se infiltran al tumor (linfocitos, monocitos y neutrófilos), algunos estudios han demostrado la expresión de selectina-E, ICAM-1, VCAM-1 y sus ligandos en metástasis tumorales. En el caso de ICAM-1 en particular, se ha descrito que su expresión por parte de las células tumorales se asocia a un mal pronóstico clínico (Vladova, 2002). Otros grupos han demostrado la participación de diferentes integrinas durante la migración e invasión de células tumorales, principalmente a través de las interacciones entre estos receptores y la matriz extracelular o el citoesqueleto de actina. Por otro lado, en melanomas humanos se ha detectado la sobre-expresión de las integrinas $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, y $\alpha6\beta1$, misma que ha sido correlacionada con la progresión tumoral (Cohen *et al*, 2001, Webb y Vande, 2000).

¿ LOS TUMORES PREPARAN SU INVASIÓN ?

Se ha postulado que las células metastásicas pueden secretar factores que modifican el fenotipo endotelial de tal manera que se favorezca la invasión metastásica. Se ha encontrado una correlación entre la proliferación de CEs y la expresión tanto de VEGF como de receptores para esta molécula por parte de tumores. Así mismo, el VEGF se considera necesario para la angiogénesis tumoral en glioblastomas e incluso suficiente para la formación de nueva vasculatura (Risau, 1995).

El grupo de Hewett (2001) ha demostrado la inducción de cambios en la expresión de proteínas de superficie asociados a una mayor proliferación endotelial en respuesta a lo que en su trabajo llaman *medios condicionados* de diferentes líneas celulares de tumores humanos. Por otra parte, las investigaciones de nuestro grupo de investigación proponen que las moléculas secretadas por células tumorales participan en la adhesión de células tumorales durante los procesos de invasión metastásica. Se ha observado que las células tumorales adheridas alteran su forma, sugiriendo que la unión de las moléculas de adhesión con sus contra-receptores transducen señales que resultan en un cambio del citoesqueleto (Estrada-Bernal *et al*, 1998 y 2003b). Estrada-Bernal y colaboradores también han documentado la adhesión de células de mieloma U937 marcadas con H³-timidina a una monocapa de CEs control o activadas con diferentes citocinas o productos derivados de células del mieloma humano EuHe y una línea derivada de EuHe denominada Eusebia (Estrada-Bernal *et al*, 2003a).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Poco se conoce aún acerca de los mecanismos por los cuales los tumores desarrollan metástasis, sin embargo, durante las dos décadas anteriores se ha confirmado que la localización de tumores metastásicos en distintos órganos no está determinada sólo por consideraciones anatómicas y de flujo sanguíneo, sino que se ha reconocido que las células tumorales a menudo presentan una colonización selectiva de sus órganos blanco. Esto ha sido interpretado como un tropismo dirigido, muy probablemente tanto por factores solubles secretados por células de los tejidos y órganos blanco, como por factores asociados a sus matrices extracelulares (Haier y Nicolson, 2001). En este proceso también se ha postulado que las mismas células tumorales secreten factores solubles capaces de modificar el fenotipo endotelial y contribuir a los procesos de adhesión y extravasación.

Los trabajos precedentes de nuestro grupo de investigación, han demostrado que los factores solubles secretados por las líneas de linfoma humano EuHe y Eusebia o de cáncer de glándula mamaria ZR 75.30 son capaces de inducir una activación endotelial medida indirectamente como un incremento en la adhesión de células de mieloma de la línea U937. A este modelo en el que el endotelio se activa con los factores solubles derivados de un linfoma como EuHe o de cáncer de glándula mamaria como lo es la línea ZR 75.30 y después de retirado se evalúa la adhesión de células de mieloma U937 a las CEs le hemos denominado *heterólogo*. En dicha adhesión, participan moléculas de adhesión expresadas por las CEs como respuesta a la exposición de éstas a los factores solubles tumorales (FST). Por lo tanto, con este trabajo se pretende evaluar si los FST funcionan también en modelos *homólogos* estimulando con los FST de las células de cáncer de glándula mamaria ZR 75.30 o MCF-7 y evaluando posteriormente la adhesión de las células ZR 75.30 o MCF-7 al endotelio pre-tratado. Nuestro trabajo parte de la premisa de que los factores liberados por células de un tipo tumoral pueden, de alguna manera, preparar al endotelio para adherir a este mismo tipo de células metastásicas.

HIPÓTESIS

Se ha descrito que las células de algunos tipos de cáncer secretan factores que inducen un fenotipo endotelial activado que les permite adherir células de mieloma U937, por lo tanto, los factores derivados de células tumorales como las líneas de cáncer de glándula mamaria ZR 75.30 y MCF-7 o las células de cáncer de cérvix HeLa, promoverán la adhesión de ellas mismas a CEs pre-estimuladas con tales FST. Los FST de las células más invasivas o metastásicas inducirán una mayor adhesión a las CEs.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la posible adhesión de células ZR 75.30, MCF-7 y HeLa a cultivos primarios de CEs humanas activadas con factores secretados por estas mismas líneas celulares.

OBJETIVOS PARTICULARES

- * Evaluar la adhesión de células U937 a cultivos primarios de células endoteliales tratadas con los factores derivados de las células ZR 75.30, MCF-7 y HeLa.
 - * Evaluar la adhesión de las células tumorales ZR 75.30, MCF-7 y HeLa a cultivos de células endoteliales tratadas con factores solubles secretados por estas mismas células en sistemas homólogos.
 - * Evaluar la expresión de moléculas de adhesión endotelial: selectina E, ICAM-1 y VCAM-1 en respuesta al estímulo con $TNF\alpha$ o con los factores solubles liberados por las células ZR 75.30, MCF-7 y HeLa.
 - * Valorar la activación del $NF-\kappa B$ asociada a la adhesión mediada por los factores derivados de las células tumorales.
-
-

MATERIAL Y MÉTODOS

Todas las soluciones referidas para la realización de las técnicas pueden encontrarse en el anexo de soluciones.

OBTENCIÓN DE LOS FACTORES SOLUBLES TUMORALES (FST)

Las células tumorales, gracias a las mutaciones en oncogenes o en genes supresores de tumores tienen la capacidad de subsistir e incluso de proliferar en condiciones muy limitadas, como ocurre en la ausencia de suero, en las que las células sanas normalmente no sobrevivirían (Lewin, 2000). Con el propósito de obtener las sustancias solubles que liberan las células tumorales, se mantuvieron en medio de cultivo libre de suero para que las mismas células, al encontrarse en un estado de estrés por carencia de nutrientes, secretaran sus propios factores de crecimiento o citocinas que les permitieran sobrevivir (Kerbel, 2000).

Las células tumorales ZR 75.30, MCF-7 y HeLa, fueron sembradas en botellas de cultivo (NUNCLON) de 75 cm², con medio RPMI -sin rojo fenol- suplementado con antibiótico-antimicótico, 5% de suero fetal bovino (SFB) y 5% de suero de ternera; mantenidas en incubación a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y humedad saturante. Una vez que llegaron al 100% de confluencia, la monocapa de células se lavó diez veces con 7 ml cada vez, con una solución amortiguadora de fosfatos PBS (NaCl, KCl, KH₂PO₄ y Na₂HPO₄) suplementado con CaCl₂ y MgCl₂ (3 y 5 mM, respectivamente) para remover y diluir los componentes del suero sin provocar desprendimiento de las células. Se les adicionó RPMI libre de suero y las células se incubaron durante 48 h más. Transcurrido ese tiempo, se colectó el medio (que contiene los factores solubles secretados por las células tumorales), se centrifugó y se colectó el sobrenadante en tubos Falcon estériles de 50 ml, llenándolos con no más de 40 ml. El medio se colectó y congeló hasta tener la cantidad de tubos que conjuntaran un volumen considerable (>500 ml). Al tener tal volumen, el medio derivado de las células tumorales se liofilizó para posteriormente resuspender el polvo obtenido en 10% del volumen original en H₂O. Se dializó con membrana de

ultrafiltración PM-10 contra PBS pH 7.4, obteniendo un medio al que nombramos FST (Factores Solubles Tumorales), al cual se le cuantificó el contenido de proteína mediante reactivo de Bradford.

CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES

Actualmente, el modelo empleado con más frecuencia para el estudio de células endoteliales lo constituyen las células endoteliales derivadas de vena umbilical humana (HUVECs). Estas células fueron obtenidas y cultivadas exitosamente por primera vez por Jaffe en 1973, quien estableció la metodología para el uso de la vena umbilical como una fuente disponible y fácil de procesar para la obtención de CEs. A la fecha, las HUVECs son y han sido empleadas para diversos estudios que han permitido estudiar a fondo el funcionamiento *in vitro* de células del endotelio vascular humano. Diversos grupos, incluyendo el nuestro, han empleado a las HUVECs para estudiar la participación endotelial en el proceso inflamatorio (Nachman, 2004).

Los cordones o venas umbilicales utilizados en estos experimentos fueron obtenidos del Hospital de Gineco-Obstetricia Dr. Luis Castelazo Ayala del IMSS bajo los protocolos de investigación previamente aprobados por los comités de ética e investigación de este centro de salud. Una vez colectados los cordones fueron transportados y mantenidos en frío en PBS hasta el momento de ser procesados. Los cultivos primarios de células endoteliales se obtuvieron realizando una digestión enzimática en la vena umbilical durante 15 min a 37°C con colagenasa tipo IV al 0.02% disuelta en una solución de HEPES 1%. La solución disgregante que contenía a las células, se colectó y centrifugó a 1200 rpm durante 10 min. El botón celular obtenido se resuspendió en medio de cultivo M-199 suplementado con 10% de SFB, antibiótico y antimicótico. El paquete celular de cada 3-4 cordones se resuspendió en 10 ml de M-199, fue sembrado en cajas petri (NUNC) nuevas y estériles de 100 x 20 mm. Las HUVECs se mantuvieron en incubación a 37°C con atmósfera de CO₂ al 5% y humedad saturante. A las 24 h de haber sido sembradas, las HUVECs se lavaron cuidadosamente 2-3 veces (según la cantidad

de detritus y hematíes que tuviera el cultivo) con 8 ml de PBS suplementado con 3 mM de CaCl_2 y 5 mM de MgCl_2 (PBS- $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$) para liberar al cultivo de detritus y eritrocitos. Lavados similares se realizaron cada dos días hasta obtener un cultivo semiconfluyente.

Al llegar al estado semiconfluyente, se despegaron las células con 2 ml de una solución de tripsina 0.1% (Sigma, St Louis MO, USA) preparada en una solución de verseno (NaCl, KCl, Tris y EDTA) durante 5 min a 37°C. Las células se colectaron y se resuspendieron en medio de cultivo M-199 recuperándose en tubos cónicos (Corning) de 50 ml. Las HUVECs se separaron de la solución con tripsina por centrifugación a 1200 rpm durante 4-6 min. Se resuspendieron nuevamente en M-199 y se sembraron en placas de cultivo de 48 pozos a una densidad de 30,000 células/cm². Aproximadamente en 3 días los cultivos se encontraban confluentes y listos para realizar los ensayos de adhesión.

Durante todo el tiempo del proyecto se generaron cultivos de HUVECs que se propagaron por no más de 2 pases. Para obtener los extractos de proteína total usados en los ensayos de inmunoanálisis tipo western blot y para obtener extractos de proteína nuclear para el ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA), las células endoteliales fueron sembradas en cajas petri de 100 x 20 mm hasta llegar a un 90% de confluencia. Para los ensayos de citometría, las células endoteliales se sembraron en placas de cultivo de 6 pozos a una densidad de 80×10^3 células/cm².

ENSAYOS DE ADHESIÓN

Este ensayo fue desarrollado en el laboratorio para medir la capacidad de las HUVECs de establecer uniones firmes, mediadas por entidades moleculares, con células en suspensión de la línea U937. Para lograr cuantificar la cantidad de células adheridas a la monocapa endotelial, se marcó a los 4 diferentes tipos de células tumorales (U937, ZR 75.30, MCF-7 y HeLa) con timidina marcada con un isótopo radiactivo. Con esta metodología fue posible establecer el porcentaje de células adheridas en los cultivos endoteliales activados, con respecto a las

adheridas en una monocapa endotelial sin previo estímulo. También se empleó siempre un control positivo de HUVECs estimuladas con 10 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ (López-Bojórquez, 2004 y Estrada-Bernal, 2003b).

Previo al experimento, 2.5×10^6 células tumorales (según la línea a utilizar para el ensayo de adhesión: U937, ZR 75.30, MCF-7 o HeLa) fueron marcadas con 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de timidina tritiada durante 24 h ($[5' -^3\text{H}]$ Thymidine de Amersham Biosciences, con actividad específica de 14.9 Ci/mmol) y las HUVECs se sembraron en placas de cultivo de 48 pozos (Costar) donde se dejó que alcanzaran 100% de confluencia.

Los ensayos de adhesión iniciaron sustituyendo el medio de cultivo de las HUVECs por soluciones que se prepararon con medio M-199 más la cantidad necesaria de los FST para tener una concentración final de 620 ng de proteína de los FST/ml. Los cultivos de células endoteliales fueron incubados con estas soluciones durante 3 h.

Por otro lado, las células tumorales previamente marcadas que se iban a co-incubar con la monocapa endotelial para evaluar su adhesión, fueron lavadas 3 veces con PBS para retirar la timidina tritiada no incorporada y se resuspendieron en medio M-199 suplementado con 10% de SFB poco antes de adicionarlas a los cultivos de células endoteliales para su co-incubación.

Luego de las 3 h de tratamiento de las HUVECs con los FST o con $\text{TNF}\alpha$ como control positivo (10 ng/ml), se retiraron las soluciones de FST y se adicionaron las células tumorales (2×10^5 células/pozo/200 μl) resuspendidas en M-199 para realizar la co-incubación con las células endoteliales durante 3 h más a 37°C. Después de esta co-incubación se removieron las células no adheridas mediante 2 lavados con $\text{PBS-Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$. Las células tumorales que permanecieron adheridas a las HUVECs después de estos lavados, y las mismas HUVECs fueron sometidas a una lisis alcalina con 500 μl de NaOH 0.2 M durante 48 h. Posteriormente, los lisados se mezclaron con 3 ml de líquido de centelleo y se leyeron en un contador de emisiones β (1600 TR PACKARD).

INMUNOANÁLISIS

Las células endoteliales en cultivos semiconfluentes en cajas petri de 100 x 20 mm, fueron estimuladas durante 3 h con soluciones de M-199 control o suplementado con 620 ng/ml de cada uno de los FST de las células tumorales HeLa, MCF-7, ZR 75.30, TNF α (10 ng/ml) como control positivo o medio de cultivo RPMI sin rojo fenol como control negativo.

Después de 3 h de tratamiento con los FST, las HUVECs fueron lavadas dos veces con PBS y lisadas con 200 μ l de solución amortiguadora de lisis. El lisado se centrifugó para colectar el sobrenadante en el cual se cuantificó la cantidad de proteína mediante el reactivo de Bradford. Utilizando en promedio 25 μ g de proteína, a los extractos de proteína total se les adicionó un amortiguador de cargado y fueron calentados en baño María hirviendo durante 5 min.

Los extractos se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) con un gel concentrador al 4%, a 35 y 80 V respectivamente. Utilizando un amortiguador de corrimiento de proteínas 1X, los extractos se dejaron correr hasta que se observó la salida del frente (aproximadamente 2 h). Las proteínas de los geles fueron transferidas -empleando un amortiguador de transferencia- a una membrana de PVDF (Membrana de transferencia Immobilon, tamaño de poro 0.45 μ m, Millipore) durante toda una noche. Posteriormente, se retiró la membrana de la cámara de transferencia y se le bloquearon los sitios inespecíficos con leche descremada en polvo (Svelty, Nestlé) preparada al 5% en TBS/Tween 0.1% durante 1 h. Los anticuerpos primarios monoclonales de ratón, anti-ICAM-1 (G-5): sc-8439 o anti-VCAM-1 (E-10): sc-13160 (Santa Cruz Biotechnology) se diluyeron 1:250 en TBS/Tween con albúmina al 1%. En las mismas soluciones de los anticuerpos primarios se diluyó un anticuerpo contra α -actina 1:1000 para detectar su presencia como control de carga.

Las membranas fueron incubadas durante 1 h con estas soluciones. Posteriormente, se lavaron las membranas con TBS-Tween y se trataron durante 45 min con un anticuerpo secundario (1:10,000 en TBS/Tween con albúmina al 1%). Este es un anticuerpo de cabra que reconoce a IgG de ratón acoplado a *HRP*

(horse radish peroxidase). La quimioluminiscencia se obtuvo al incubar las membranas con solución reveladora (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate de PIERCE). Las bandas fueron visualizadas con películas de autorradiografía (Kodak MXB).

CITOMETRÍA DE FLUJO

Este ensayo fue empleado para determinar la presencia de la molécula de adhesión selectina-E en la superficie de las células endoteliales activadas por factores solubles derivados de células tumorales o $\text{TNF}\alpha$, mediante la detección de un fluorocromo acoplado al anticuerpo contra dicha molécula.

A las HUVECs crecidas a una confluencia entre 80 y 90% en placas de cultivo de seis pozos (NUNC), se les adicionaron soluciones de los distintos FST en medio de cultivo M-199 a una concentración final de 620 ng/ml. A los pozos con las células blanco no se les adicionó estímulo alguno y a los pozos empleados como control positivo se les estimuló con 10 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$. Las células endoteliales se mantuvieron con los estímulos durante 3 h en incubación a 37°C.

Transcurridas las 3 h del estímulo, la monocapa endotelial de cada uno de los tratamientos, fue lavada 3 veces con $\text{PBS-Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ para remover los componentes de las soluciones. A partir de este momento, las células y las soluciones empleadas se mantuvieron en frío para evitar recambio de las membranas celulares. Después de los lavados con $\text{PBS-Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, éste fue retirado para adicionar a las células 1 ml de $\text{PBS-Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ con 2.5% de BSA, en donde se diluyó 1:1500 el anticuerpo contra selectina-E acoplado a avidina. La incubación con el anticuerpo primario se mantuvo a 4°C y en agitación durante 30 min en oscuridad. Posteriormente se retiró el anticuerpo primario y fueron lavados los pozos 3 veces con $\text{PBS-Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$. Para revelar el anticuerpo primario se agregó entonces a cada pozo 1 ml de streptavidina derivatizada con ficoeritrina (Phar-Mingen BECTON DICKINSON Co.) en una dilución 1:3000 con $\text{PBS-Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ más 2.5% de BSA y se mantuvo la incubación en agitación durante 30 min a 4°C. Se retiró la streptavidina derivatizada, se realizaron dos lavados con PBS y uno más con PBS EDTA 5mM. Se

incubaron las placas con 1 ml de PBS EDTA 5mM a 4°C y en obscuridad durante 15 min, verificando el desprendimiento de las células bajo el microscopio. Las células se colectaron en tubos FALCON de poliestireno de 12 x 75 mm para citometría. Fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min y resuspendidas en 500 µl de PBS para ser leídas en citómetro (FACS Scalibur BECTON DICKINSON Co.).

ENSAYO DE RETARDO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)

En este ensayo se aprovecha la interacción específica de los factores de transcripción con una secuencia particular de ADN que ha sido previamente marcada con radioactividad. Al resolver por electroforesis en un gel de acrilamida no desnaturalizante, el ADN unido a la proteína se separa del no unido, el cual corre más rápidamente, de donde deriva el nombre de retardo en la movilidad electroforética.

Para llevar a cabo el EMSA, es necesario obtener con anterioridad los extractos nucleares de las células de cada uno de los tratamientos de los que se quiere conocer si fueron capaces de promover la translocación del factor de transcripción al núcleo. Se debe también fosforilar el oligonucleótido con la secuencia de interés, preparar un gel de poliacrilamida desnaturalizante para ADN y finalmente "correr" en el gel las muestras unidas al oligonucleótido marcado. El EMSA es un ensayo que debe ser realizado con extremo cuidado y precaución, por lo que en su ejecución se siguieron todas las medidas y equipo de seguridad radiológica que la comisión de seguridad de la institución determina, debido al riesgo que existe por el uso de radiactividad.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNA NUCLEAR

Previamente los cultivos de células endoteliales en cajas petri de 100x20 mm se llevaron a una confluencia aproximada de 80-90% y fueron tratados durante 20 min con cada uno de los distintos FST, TNF α como control positivo y sin ningún estímulo para el control. Todo el procedimiento de obtención de núcleos se llevó a cabo en baño de hielo y las células fueron lisadas por congelamiento rápido.

Las células se lavaron con PBS frío y se colectaron en 1 ml de éste, raspando con espátula de plástico. Se colectaron las HUVECs en tubos Eppendorf de 1.5 ml y fueron centrifugadas durante 5 min a 3000 rpm. Luego de retirar cuidadosamente el sobrenadante, las células fueron congeladas rápidamente en un baño de hielo seco y etanol (5-10 seg). Se dejaron descongelar en hielo, se les adicionaron 100 μ l de solución hipotónica A y se resuspendieron las células en este mismo amortiguador salino hipotónico. Nuevamente fueron centrifugadas las células pero esta vez a 3500 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue retirado cuidadosamente. Al botón de núcleos se le resuspendió en 15-20 μ l de un amortiguador salino hipertónico C y se le dejó en incubación con agitación suave durante 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación, los núcleos fueron centrifugados durante 20 min a 14000 rpm a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos, que corresponden a la fracción que contiene la proteína nuclear, fueron colectados en tubos Eppendorf de 0.6 ml, adicionándoles una cantidad igual del amortiguador salino D. Se les cuantificó proteína mediante reactivo de Bradford y se les mantuvo en congelación hasta realizar el ensayo de retardo.

FOSFORILACIÓN (QUINACIÓN) DEL OLIGONUCLEÓTIDO

Usando la enzima cinasa T4 (Boehringer Mannheim), se marcó con γ^{32} P-ATP (NEN) un oligonucleótido de doble cadena con 21 pares de bases que contiene 10 bases de la secuencia consenso para el sitio de unión de NF- κ B (5'-AGT-TGA-GGG-GAC-TTT-CCC-AGG-3' de Santa Cruz). Esto se realizó incubando la enzima (0.5 μ l), el oligonucleótido (1 μ l), la marca radiactiva (0.5 μ l), una solución amortiguadora (1 μ l) y agua (7 μ l), en un tubo Eppendorf de 1.5 ml a 37°C durante 30 min. Posteriormente, la reacción se detuvo calentando a 65°C durante 15 min. Posterior a la incubación se agregaron 30 μ l de TBE 1X y se conservó en congelación en un recipiente de plomo hasta el día de usarlo en el ensayo de retardo.

PREPARACIÓN Y CORRIMIENTO DEL GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE PARA ADN

Se preparó un gel de acrilamida al 7.5% y se pre-corrió a 80 volts durante 1 h. Durante ese tiempo se preparó una mezcla con BSA, DTT, Poli dI/dC y solución amortiguadora, el cual fue usado para todas las muestras. La mezcla de reacción para cada muestra se realizó en tubos Eppendorf colocando 5 μ l de la mezcla, 10 μ g de proteína contenida en menos de 13 μ l, 1 μ l del oligonucleótido marcado y se completaron 19 μ l con agua bidestilada, dejando incubar a temperatura ambiente durante 20 min. Justo antes de cargar las muestras en el gel, se les adicionaron 2 μ l de amortiguador de carga a cada muestra. Una vez cargadas todas las muestras en el gel, éste se corrió a 80 volts durante el tiempo necesario para que entraran las muestras en el gel. Posteriormente, se subió el voltaje a 100 para correr el gel durante 1.5 -2 h más evitando la salida del frente.

Con mucho cuidado, el gel fue retirado de la cámara para colocarse entre rectángulos de papel filtro ligeramente más grandes que el gel. Se envolvieron en papel celofán dulce y se colocaron en una secadora de geles (Gel Dryer Model 583, BIO-RAD) a 90°C conectada a una bomba de vacío (HydroTech™ Vacuum Pump, BIO-RAD). Se dejó secar el gel durante 1.5 h, se colocó en un cassette para retardos durante toda una noche y finalmente se obtuvo la imagen del mismo en un equipo Thyphon 9400. La imagen se analizó con el programa Image Quant (Molecular Dynamics, CD).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante pruebas de *t student* por grupos pareados con el programa estadístico Sigma Plot 7.0

Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando *P* fue menor de 0.05

RESULTADOS

ENSAYOS DE ADHESIÓN BASAL

Con la finalidad de establecer el tiempo al cual se realizarían los ensayos y conocer la adhesión basal de cada línea celular a la placa de cultivo con respecto al tiempo, se realizaron curvas de adhesión a la placa de cultivo de cada una de las líneas celulares empleadas. En todos los ensayos de adhesión, los porcentajes se obtuvieron con respecto al 100% de células sembradas (200,000 células/pozo).

Se observó que las células de cada línea presentan un comportamiento distinto en la adhesión a la superficie de la placa de cultivo. Las células de la línea MCF-7 fueron las que tuvieron el mayor porcentaje de adhesión en cada uno de los tiempos evaluados, a partir de los 40 min (Figura 12) se alcanza el 50% de adhesión. En contraste, las células HeLa alcanzaron el 50% de adhesión aproximadamente a las 4 1/2 h. Las células ZR 75.30 alcanzaron el 50% de adhesión 6 h después de iniciado el ensayo. Las células de las líneas ZR 75.30 y HeLa requieren un tiempo mayor a 3 h para que se adhiera el 50% de ellas (Figuras 11 y 13).

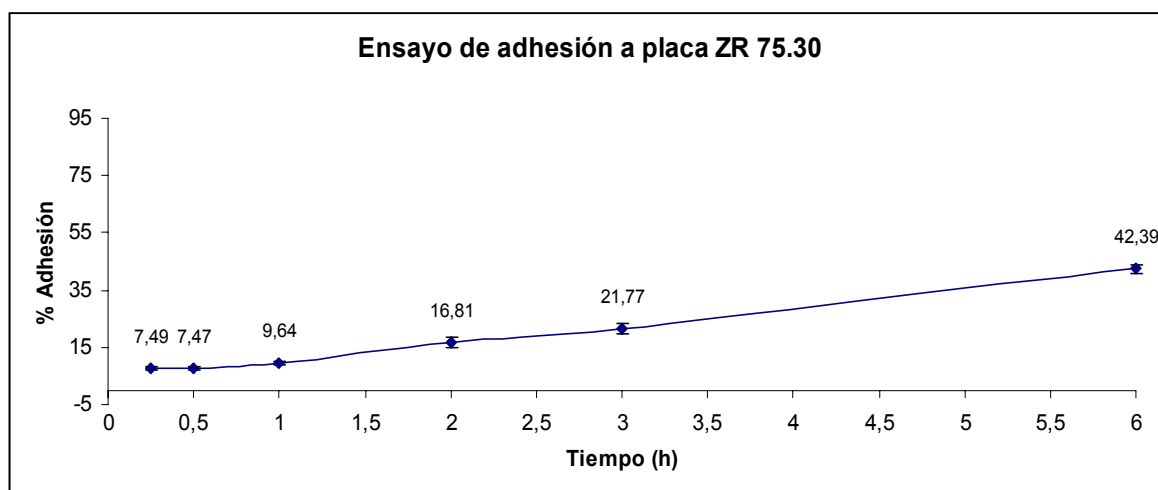


Figura 11. Gráfica que muestra la curva de adhesión-tiempo de células de la línea ZR 75.30 a la caja plástica en condiciones estándar de cultivo. Se muestran los resultados de 5 experimentos independientes, cada uno por triplicado y se muestra el error estándar.

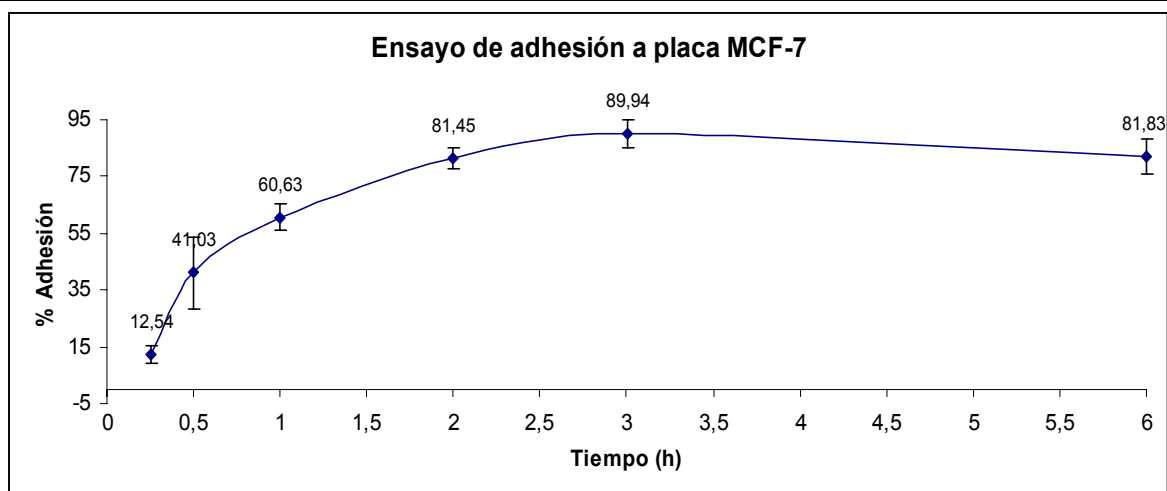


Figura 12. Gráfica que muestra la curva del porcentaje de adhesión con respecto al tiempo de células de la línea MCF-7 que se adhieren a la caja plástica en condiciones estándar de cultivo. La gráfica es resultado de 5 experimentos independientes, cada uno por triplicado. Las barras muestran el error estándar.

En comparación con células MCF-7, las células HeLa son 9 veces más lentas y las ZR 75.30 12 veces más lentas para adherirse a la superficie plástica de la placa de cultivo.

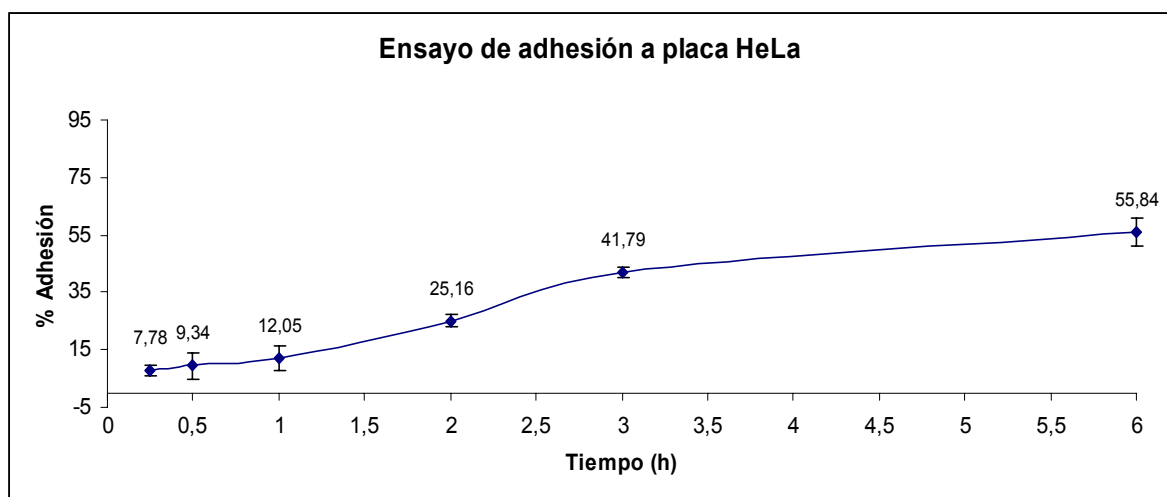


Figura 13. Gráfica que muestra el comportamiento de adhesión de células de la línea HeLa a la caja plástica en condiciones estándar de cultivo con respecto al tiempo. La gráfica es resultado de 5 experimentos independientes, cada uno por triplicado y se muestra el error estándar.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EN LOS FST

A cada uno de los factores solubles tumorales de células ZR 75.30, MCF-7 y HeLa, se les cuantificó el contenido proteico mediante reactivo de Bradford, observando que, a pesar de que el procedimiento para la obtención de los FST se llevó a cabo de la misma forma para cada línea celular, cada una de ellas secreta una cantidad de proteína diferente, siendo notoria la mayor cantidad de proteína presente en los FST secretados por las células MCF-7 (Tabla 1).

Con el fin de emplear las dosis más grandes posibles de proteína de los FST, se usó como punto de partida una dilución 1:1 de los FST con el medio de cultivo M-199. Con base a esto y a la menor concentración de proteína total obtenida en los FST de las células HeLa, se estableció una concentración máxima de estos FST, la cual fue de 620 ng/ml. Para las soluciones de FST de ZR 75.30 y MCF-7 se calculó la cantidad necesaria de estos FST, de tal manera que la concentración final de proteína de FST empleada en todos los experimentos siempre fue de 620 ng/ml.

Concentración de proteína en los factores solubles tumorales		
FST	ng/ μ l	Vol de FST/ml
ZR 75.30	1.64	378 μ l
MCF-7	4.46	139 μ l
HeLa	1.24	500 μ l

Tabla 1. Cuantificación de proteína total en cada uno de los factores solubles tumorales una vez que fueron liofilizados y concentrados (ver obtención de FST en metodología). Promedio de 3 mediciones independientes a lo largo del proyecto, se observó que el tiempo en refrigeración no afectó la concentración de proteína de los FST.

ADHESIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES ZR 75.30, MCF-7 Y HeLa A DISTINTAS SUPERFICIES

Con el fin de comparar la adhesión de las células tumorales al plástico o a la monocapa endotelial se midió la adhesión al endotelio después de 3 h sin estímulo previo y la adhesión de células tumorales a la placa de cultivo a un tiempo similar (Tabla 2).

% Adhesión		
Línea celular	Superf. plástica	HUVECs
ZR 75.30	21.77	24
MCF-7	89.94	47.7
HeLa	41.79	48.54

Tabla 2. Datos de los porcentajes de células ZR 75.30, MCF-7 y HeLa adheridas después de 3 h de sembrarlas en dos superficies distintas (placa de cultivo y monocapa de HUVECs)

Las células con menor variación en la adhesión a la monocapa endotelial comparada con la adhesión a la superficie plástica de la placa de cultivo fueron las de la línea ZR 75.30. Por tal razón se decidió hacer una comparación más extensa de la cinética de adhesión de estas células a la monocapa endotelial. La Figura 15 muestra la adhesión con respecto al tiempo a cada una de las superficies, donde podemos observar que la monocapa endotelial sin previo estímulo y la superficie plástica de la placa de cultivo no representan superficies distintas para la adhesión de células de la línea ZR 75.30.

% de adhesión (ZR 75.30)		
Tiempo	HUVECs	Plástico
1 h	10.59	9.64
2 h	14.85	16.81
3 h	24.0	21.77
4 h	27.33	-----
6 h	31.07	42.39

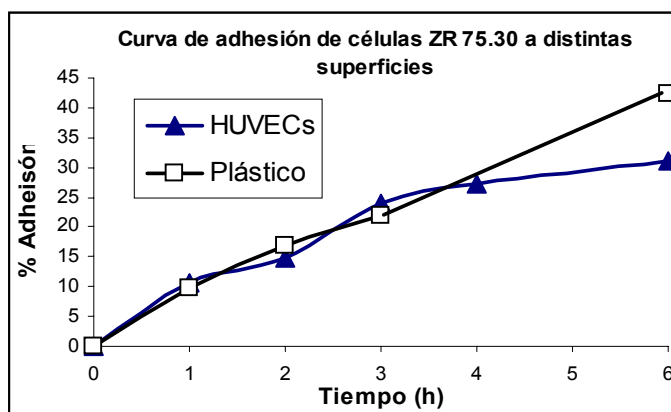


Figura 15. Datos de la curva de adhesión con respecto al tiempo por parte de las células ZR 75.30 a una monocapa de células endoteliales (HUVECs) o a la superficie plástica de la placa de cultivo y gráfica comparativa de la adhesión de células ZR 75.30 a dos diferentes superficies. Aunque las líneas se separan ligeramente con el tiempo, no hay diferencia de adhesión importante a las 3 h, que es el tiempo al cual se realizaron todos los ensayos de adhesión.

ENSAYOS DE ADHESIÓN HETERÓLOGA

Como ya se mencionó en los antecedentes, en los estudios previos del laboratorio se evaluó un modelo de adhesión heteróloga con células de mieloma U937. Con esta metodología se comprobó que una línea de células en suspensión como lo son las U937 pueden adherirse a una monocapa de células endoteliales obtenidas de vena umbilical humana (HUVECs) previamente estimulada con factores solubles secretados por células de linfoma de las líneas EuHe y Eusebia.

Con el fin de conocer si la estimulación de las HUVECs con cada uno de los distintos FST favorece la adhesión de uno u otro tipo celular, en los ensayos de adhesión heteróloga prácticamente se evaluó la adhesión de las cuatro líneas celulares de tumores humanos empleadas en este proyecto, contra cada uno de los FST obtenidos. Con estos ensayos se observó que la adhesión de las células tumorales de las líneas ZR 75.30, MCF-7 y HeLa a la monocapa endotelial presentó un comportamiento un tanto distinto al que mostraron al adherirse a la superficie de la placa de cultivo.

ADHESIÓN HETERÓLOGA CON CÉLULAS U937

La evaluación de la adhesión de las células U937 a la monocapa de células endoteliales se llevó a cabo en diversas condiciones: sin estimular (CTRL) y estimulando con $\text{TNF}\alpha$ o con los FST de las líneas ZR 75.30, MCF-7 y HeLa. El ensayo se realizó siempre con un total de 200,000 células U937 co-incubadas con la monocapa endotelial (en pozos de 1 cm^2). Por una parte para corroborar la funcionalidad del modelo y por otra para conocer si el fenómeno de adhesión se repetía con FST secretados por otras líneas de células tumorales. Se encontró que, efectivamente, siempre se presenta una adhesión basal de las células U937; adhesión que aumenta cuando los cultivos endoteliales son previamente tratados durante 3 h tanto con $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) como con cada uno de los FST (620 ng/ml) de las líneas evaluadas en este trabajo (Figura 14).

Los factores solubles secretados por células ZR 75.30 ejercen un efecto similar al causado por el $\text{TNF}\alpha$, mientras que los FST de las células HeLa y MCF-7 no provocaron una adhesión significativamente distinta a la adhesión basal de células U937 a HUVECs sin estimular (CTRL).

La adhesión de las células U937 al endotelio pre-tratado con los FST derivados de ZR 75.30 fue 2.1 veces mayor al basal y no fue estadísticamente diferente de la adhesión inducida por $\text{TNF}\alpha$ que fue 2.8 veces mayor a la basal. Los FST de MCF-7 o de células HeLa no indujeron adhesión por encima de la basal.

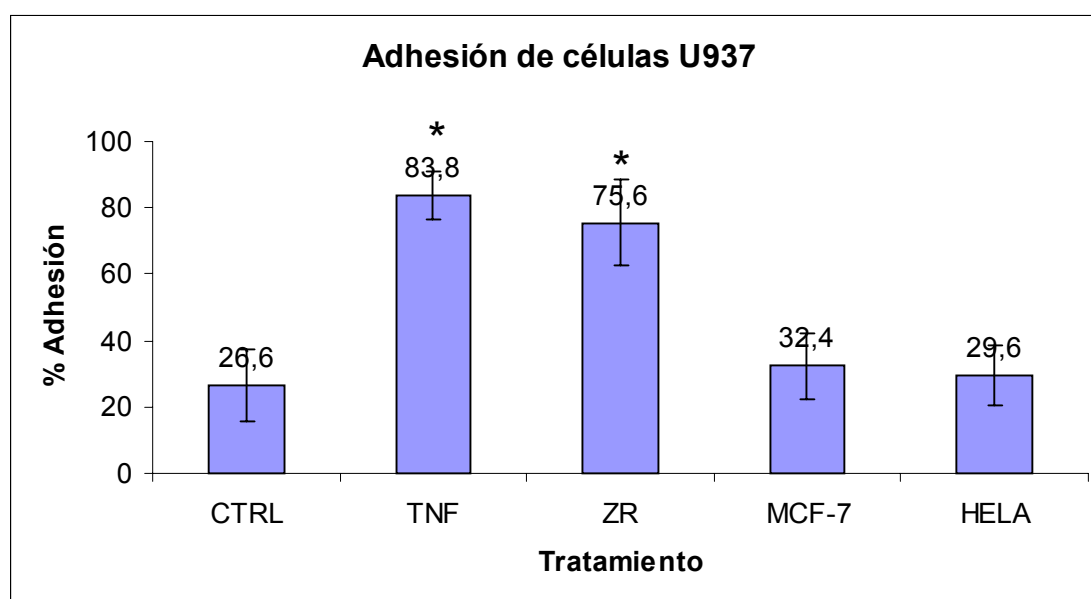


Figura 14. Gráfica que muestra porcentajes de adhesión de células U937 a HUVECs tratadas por 3 h con 620 ng/ml de los distintos FST o 10 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ como control positivo. Las células U937 fueron co-incubadas con las células endoteliales durante 3 h después de lavar el estímulo inicial. Promedios de 6 experimentos independientes, cada uno por triplicado. Se muestra el error estándar. * $P < 0.05$ células sin tratamiento o control (CTRL) Vs. todos los tratamientos.

ADHESIÓN HETERÓLOGA DE CÉLULAS ZR 75.30

Cuando la monocapa endotelial ha sido previamente activada, representa una superficie más adhesiva que la superficie plástica para las células ZR 75.30. Con respecto al control, todos los tratamientos aumentan el número de células ZR 75.30 que se adhieren, pero es importante hacer notar que los factores solubles secretados por las mismas células ZR 75.30 hacen a la superficie endotelial mucho más adhesiva para ellas mismas (adhesión homóloga). El estímulo adhesivo

inducido por los FST de las células ZR 75.30 fue incluso mayor a la adhesión de provocada por el estímulo de las HUVECs con el control positivo $\text{TNF}\alpha$ (Figura 16).

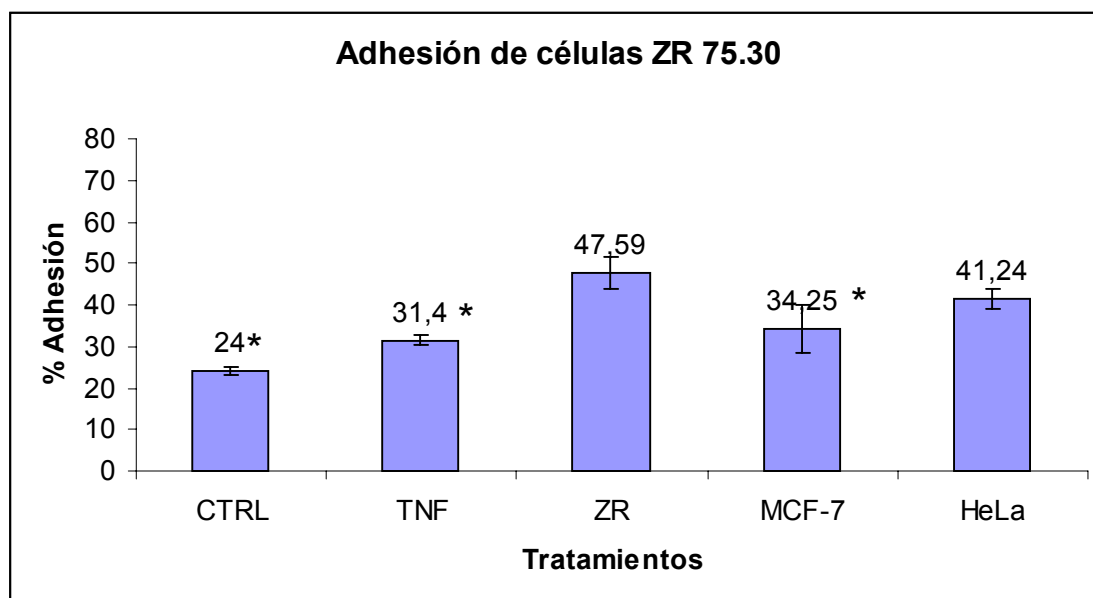


Figura 16. Gráfica del porcentaje de células ZR 75.30 adheridas a las células HUVECs después de una co-incubación de 3 h con las células endoteliales previamente estimuladas con los diferentes tratamientos. * $P < 0.05$ ZR 75.30 Vs. todos los tratamientos. Promedios de 7 experimentos independientes por triplicado.

ADHESIÓN HETERÓLOGA DE CÉLULAS MCF-7

Con la gráfica de adhesión de células de la línea MCF-7 a cultivos endoteliales, podemos decir que esta línea celular se adhiere con eficiencia a las HUVECs aún sin ningún tratamiento (48% de adhesión). Ni el $\text{TNF}\alpha$, ni los FST de HeLa o de las mismas MCF-7 modifican este comportamiento (Figura 17). Sin embargo, los FST de las células ZR 75.30 sí inducen un incremento del 40% con respecto a la adhesión a células no estimuladas. Considerando que la adhesión basal de las células MCF-7 a la superficie plástica de la placa de cultivo alcanzó un valor de 80% en 3 h posteriores a la siembra, este valor no se obtuvo al sembrar las células MCF-7 sobre una superficie confluyente de células endoteliales tanto con cualquiera de los estímulos, como sin ellos, en el mismo intervalo de tiempo.

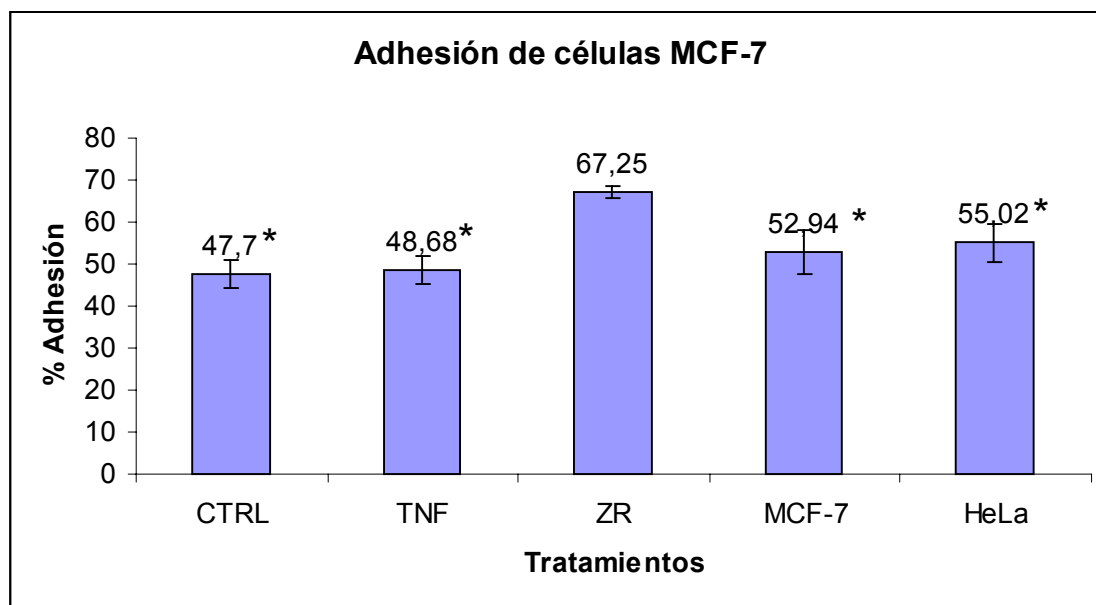


Figura 17. Gráfica del porcentaje de células MCF-7 adheridas a células HUVECs después de una co-incubación de 3 h con las células endoteliales previamente estimuladas con los diferentes tratamientos. * $P < 0.05$ ZR 75.30 Vs. todos los tratamientos. Promedios de 7 experimentos independientes, cada uno por triplicado.

ADHESIÓN HETERÓLOGA DE CÉLULAS HeLa

La capacidad de adhesión de las células HeLa a la monocapa endotelial no varió con o sin tratamiento (Figura 18). Al igual que las células ZR 75.30, las células HeLa no muestran diferencias entre la adhesión a la superficie plástica de la placa de cultivo y la adhesión al endotelio en estado de reposo. En otras palabras, la monocapa endotelial sin estímulo previo, no ofrece una superficie más adhesiva que la superficie plástica de la placa de cultivo para las células HeLa, ya que el porcentaje de estas células que se adhieren al endotelio es estadísticamente igual al valor obtenido en la adhesión a una superficie plástica (ver Tabla 3).

A diferencia de las células ZR 75.30, el endotelio previamente estimulado con FST o $TNF\alpha$ no modifica el número de células HeLa adheridas a las HUVECs.

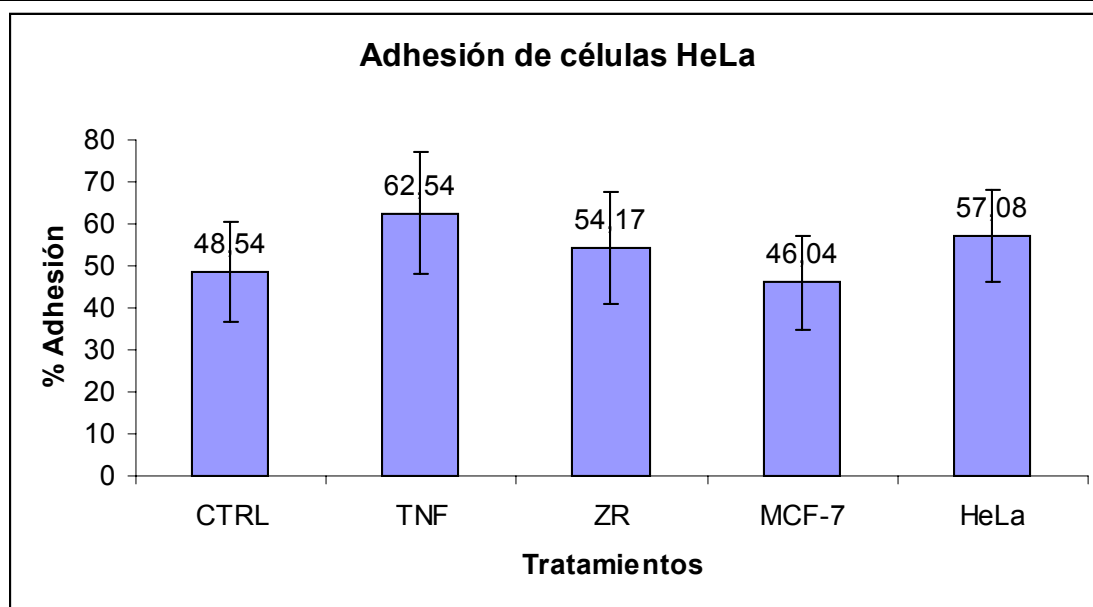


Figura 18. Gráfica del porcentaje de células HeLa adheridas a células HUVECs después de una co-incubación de 3 h con las células endoteliales previamente estimuladas con los diferentes tratamientos. Promedios de 6 experimentos independientes, cada uno por triplicado. Se muestra el error estándar.

ENSAYOS DE ADHESIÓN HOMÓLOGA

En los ensayos de adhesión homóloga se evaluó la capacidad de adhesión de las células pertenecientes a las tres líneas tumorales al co-incubarse con una monocapa de células endoteliales previamente tratadas con factores solubles secretados por las mismas células. Aunque ya se mostraron los resultados de la adhesión heteróloga y homóloga en las figuras 16-18, la figura 19 agrupa los datos correspondientes a la adhesión homóloga.

La figura 19 presenta tres bloques, cada uno de ellos representa el promedio de 6-7 experimentos independientes (cada uno por triplicado) de la co-incubación de cada tipo de células tumorales (ZR 75.30, MCF-7 o HeLa) con una monocapa endotelial en tres diferentes condiciones: sin estímulo (Ctrl), con un tratamiento de 3 h con 10 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ o con 3 h previas de estímulo con 620 ng/ml de los FST de la línea celular correspondiente.

Se observó que los FST provenientes de células ZR 75.30 fueron capaces de aumentar 2 veces la adhesión de las mismas células ZR con respecto a las

adheridas al endotelio control, siendo incluso mayor que la adhesión inducida por nuestro control positivo $\text{TNF}\alpha$ (1.3 veces).

En los casos de la adhesión de células MCF-7 y HeLa, el porcentaje de células tumorales adheridas a la monocapa endotelial en las tres condiciones no mostraron diferencia estadísticamente significativa. Por lo que podemos decir que las células tumorales de las líneas MCF-7 y HeLa se adhieren a una monocapa endotelial en reposo de la misma manera que a la monocapa endotelial estimulada con sus propios FST.

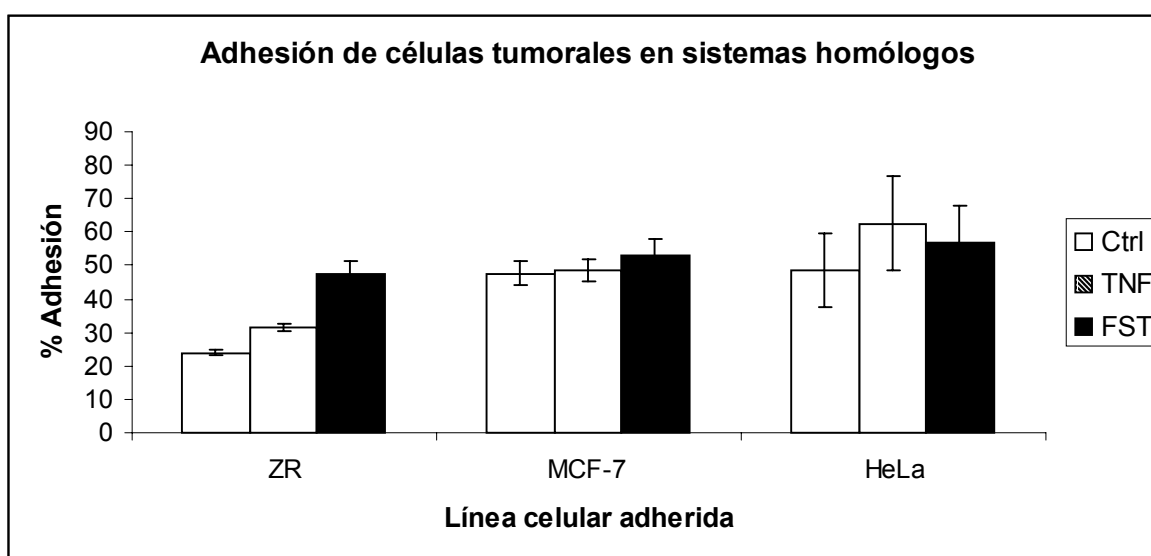


Figura 19. Porcentaje de adhesión homóloga obtenida al co-incubar por 3 h cada una de las líneas celulares tumorales con HUVECs previamente estimuladas durante 3 h con los FST (620 ng/ml) de la línea celular correspondiente. El control (Ctrl) corresponde al endotelio sin estimular y $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) fue empleado como control positivo.

CITOMETRÍA DE FLUJO

Considerando la propuesta de que el proceso de adhesión de células de la respuesta inmune a un endotelio activado por citocinas en la respuesta inflamatoria es, en muchos aspectos, semejante a un proceso metastásico, se evaluó la expresión de selectina-E, ya que es la molécula que se expresa en las primeras etapas que siguen al estímulo de activación endotelial y que permite el

reconocimiento y la adhesión laxa entre células polimorfonucleares (PMN) y endoteliales (Simiantonaki *et al*, 2002).

Esta evaluación fue realizada mediante citometría de flujo, de donde se obtuvieron los histogramas que muestran la intensidad de fluorescencia (FL2-H) del anticuerpo marcado con ficoeritrina que reconoce a la selectina-E, contra el número de eventos (células) que presentaron señal fluorescente de un total de 10000 eventos analizados (Figuras 20 y 21).

La intensidad relativa de fluorescencia (IRF) se dividió en dos regiones denominadas M1 y M2. M1 comprende un IRF de 10^0 a 1×10^1 y se consideró como una señal basal. M2 comprende un IRF de 1×10^1 a 10^3 y se consideró como una señal positiva a selectina-E.

El endotelio sin tratamiento presentó un promedio de IRF de 7.4 (promedio de la IRF de toda la población). Al ser tratado con $TNF\alpha$, la IRF de las HUVECs aumentó a 113.22, un aumento de 15 veces con respecto a las HUVECs sin tratamiento.

El estímulo con los FST de células ZR 75.30 dio un promedio de IRF de 61.69 que corresponde a 8 veces el valor de la IRF de las HUVECs control (Figura 20 y Tabla 3).

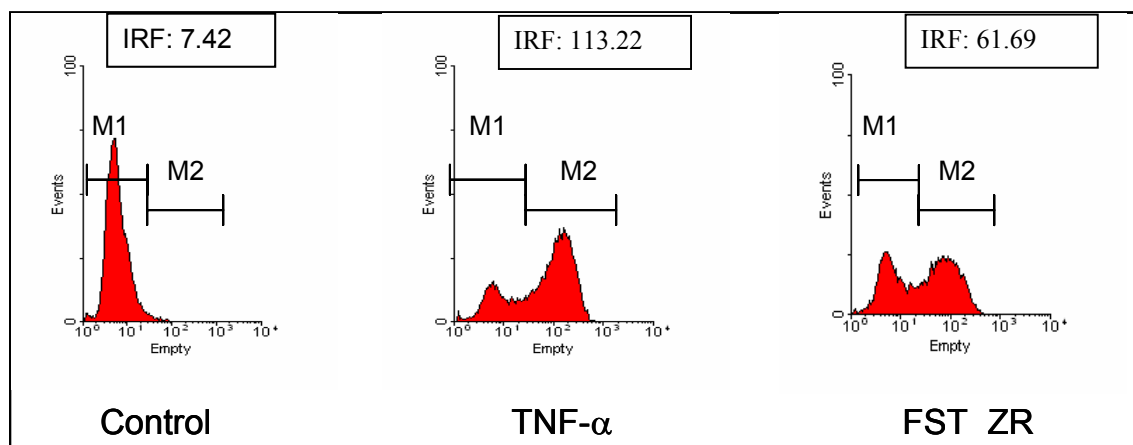


Figura 20. Efecto del $TNF\alpha$ (10 ng/ml) y de los FST de células ZR 75.30 (620 ng/ml) en la expresión de selectina-E en HUVECs tratadas por 3 h con estos factores. IRF en el eje X y porcentaje de eventos en el eje Y. IRF: Intensidad relativa de fluorescencia.

El tratamiento con los FST de MCF-7 y HeLa produjo un promedio de IRF de 6.84 y 6.55 respectivamente, que corresponden al 0.9 del IRF de las HUVECs control

(Figura 21 y Tabla 3). Esto nos indica que no hubo expresión de selectina-E en las HUVECs tratadas con estos factores y nos sugiere también, que la composición del medio obtenido de células ZR 75.30 (y no los de células MCF-7 y HeLa) contiene factores solubles capaces de inducir la expresión de selectina-E en el endotelio.

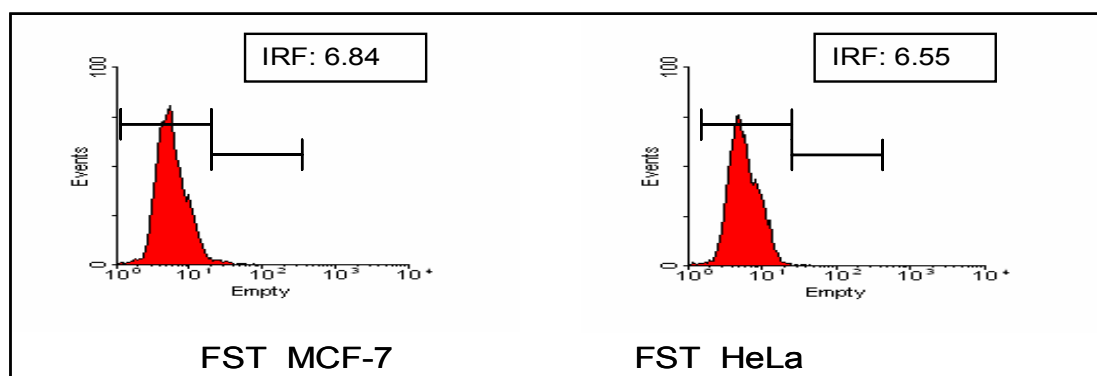


Figura 21. Efecto de los FST de células MCF-7 y HeLa (620 ng/ml) en la expresión de selectina-E en HUVECs tratadas por 3 h con estos factores. IRF en el eje X y porcentaje de eventos en el eje Y. IRF: Intensidad relativa de fluorescencia.

Al analizar la distribución de eventos entre M1 (negativo a selectina-E) y M2 (positivo a selectina-E) se obtuvieron los valores que se observan en la tabla 3.

Tratamiento	IRF	Veces de aumento	% de eventos M1	M2	Aumento con respecto al control
Control	7.4	----	97	3	-----
TNF α	113	15	24	76	25 veces
ZR 75.30	62	8	42	58	19 veces
MCF-7	7	0.9	98	2	0.6 veces
HeLa	6	0.9	99	1	0.3 veces

Tabla 3. Datos derivados del análisis de los histogramas de la citometría de flujo para determinar la presencia de selectina-E en HUVECs tratadas con 10 ng/ml de TNF α o con 620 ng/ml de los distintos FST. **IRF** es la intensidad relativa de fluorescencia, **M1** corresponde a la región asignada para una señal negativa a selectina-E y **M2** corresponde a la región asignada como señal positiva a selectina-E. Se muestran las veces de aumento de la IRF con respecto al control y las veces de aumento del porcentaje de eventos en M2 de cada tratamiento con respecto al control.

Sólo los FST de ZR 75.30 resultaron en una señal positiva para selectina-E.

INMUNOANÁLISIS

Otras moléculas de adhesión evaluadas en el endotelio tratado con los FST fueron ICAM-1 y VCAM-1 que son responsables de la adhesión firme y la trans migración de monocitos y neutrófilos durante la reacción inflamatoria y se expresan poco después de la selectina-E en respuesta al estímulo endotelial con citocinas proinflamatorias (Simiantonaki *et al*, 2002). La expresión de estas moléculas fue realizada por Inmunoanálisis con anticuerpos monoclonales para cada una de ellas. Se observó la sobre-expresión de la molécula ICAM-1 por parte de las HUVECs en respuesta al tratamiento con los FST de ZR 75.30 o TNF α (Figura 22).

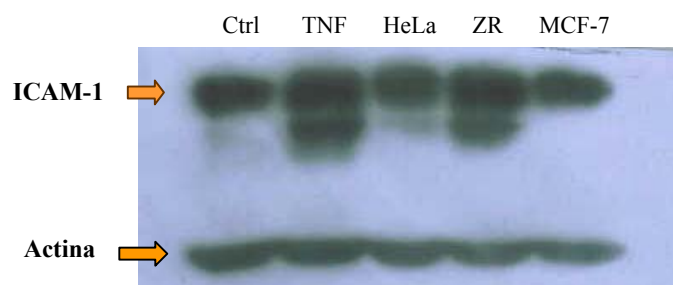


Figura 22. Inmunoanálisis de ICAM-1 expresada por HUVECs en respuesta a 3 h de tratamiento con los distintos estímulos. Los FST fueron previamente tratados por 45 min con polimixina B. Se empleó TNF α (10 ng/ml) como control positivo. La actina sirvió como control de carga.

En el inmunoanálisis de la figura 23 se puede observar que se indujo la sobre-expresión de la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) en las células endoteliales luego de 3 h de estímulo con los FST de ZR 75.30 o con la citocina TNF α . Los factores solubles de HeLa y MCF-7 no tuvieron efecto en la expresión de esta molécula de adhesión al compararse con el control.

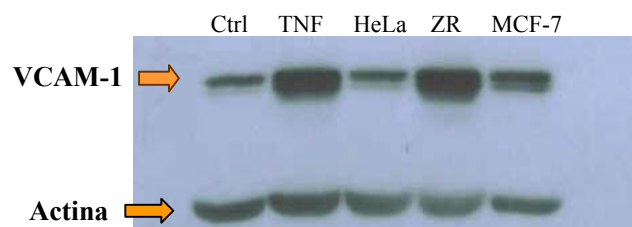


Figura 23. Inmunoanálisis donde se observa la inducción de la expresión de VCAM-1 en células endoteliales sometidas por 3 h al estímulo con los distintos factores solubles. Los FST fueron previamente tratados por 45 min con polimixina B. El control positivo fue TNF α (10 ng/ml) y la actina sirvió como control de carga.

ENSAYO DE RETARDO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

Es muy conocida la participación del factor de transcripción NF- κ B en la expresión de genes de moléculas de respuesta temprana involucradas en las interacciones célula-célula, reclutamiento celular y trans migración. Su activación puede iniciar por diversas señales que incluye citocinas, agentes infecciosos virales y bacterianos, metales tóxicos, luz UV y estrés oxidativo. Los promotores de los genes de selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 presentan sitios de unión al factor NF- κ B. En células endoteliales este factor se reconoce como un elemento esencial para su expresión (Chen *et al*, 2001).

Para conocer si la expresión de moléculas de adhesión y, por tanto, la adhesión mostradas en las figuras anteriores son mediadas por la translocación al núcleo del factor NF- κ B inducida por los FST, se realizó un ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).

Se encontró que tanto TNF α como los FST de ZR 75.30 inducen la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B en HUVECs. Los FST de las células MCF-7 y HeLa provocaron translocación al núcleo del factor NF- κ B mucho menor a la inducida por los FST de ZR 75.30, pero claramente superior al control (Figura 24).

Se puede notar además una diferencia en las bandas registradas en el segundo y tercer carril, pues mientras que en el carril correspondiente a TNF α son notables 2 bandas, en el carril de ZR 75.30 se detecta la presencia sólo de la banda con mayor movilidad.

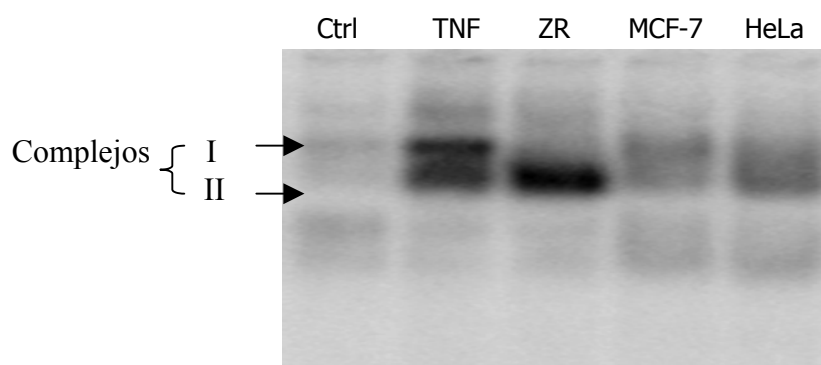


Figura 24. Ensayo de retardo en la movilidad electroforética que muestra la activación del NF- κ B en HUVECs tratadas con distintos factores solubles tumorales. TNF α sirvió como control positivo. Las flechas indican dos complejos de NF- κ B.

**RESUMEN GENERAL DE LOS EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS
HUVECs**

Células co-incubadas	FST			
	ZR 75.30	MCF-7	HeLa	TNF α
U937	+++	-	-	+++
ZR 75.30	++	-	-	+
MCF-7	+	-	-	-
HeLa	-	-	-	-

Tabla 4. Tabla donde se muestra de manera general que sólo los FST de células ZR 75.30 fueron capaces de favorecer la adhesión de algunos tipos de células tumorales al endotelio.

Moléculas de adhesión	FST			
	ZR 75.30	MCF-7	HeLa	TNF α
Selectina-E	++	-	-	+++
ICAM-1	++	-	-	+++
VCAM-1	+++	-	-	+++

Tabla 5. Efecto de los FST sobre la expresión de moléculas de adhesión en HUVECs después de 3 h de tratamiento.

NF- κ B	FST			
	ZR 75.30	MCF-7	HeLa	TNF α
Translocación al núcleo	++	+	+	+++

Tabla 6. A los 20 min de adicionar los FST a las HUVECs, sólo los FST de ZR 75.30 fueron capaces de promover la translocación del factor nuclear- κ B.

Por otra parte, se quiso evaluar un posible efecto tóxico de los factores solubles de las tres líneas tumorales empleadas sobre las HUVECs cuando se dejaban por tiempos mayores a las 3 h empleadas en todos los experimentos descritos hasta aquí. Por lo tanto se agregaron los factores solubles a cultivos endoteliales y se mantuvieron en incubación durante 72 h. La figura 25 muestra a las HUVECs después de 72 h de incubación sin o con los FST.

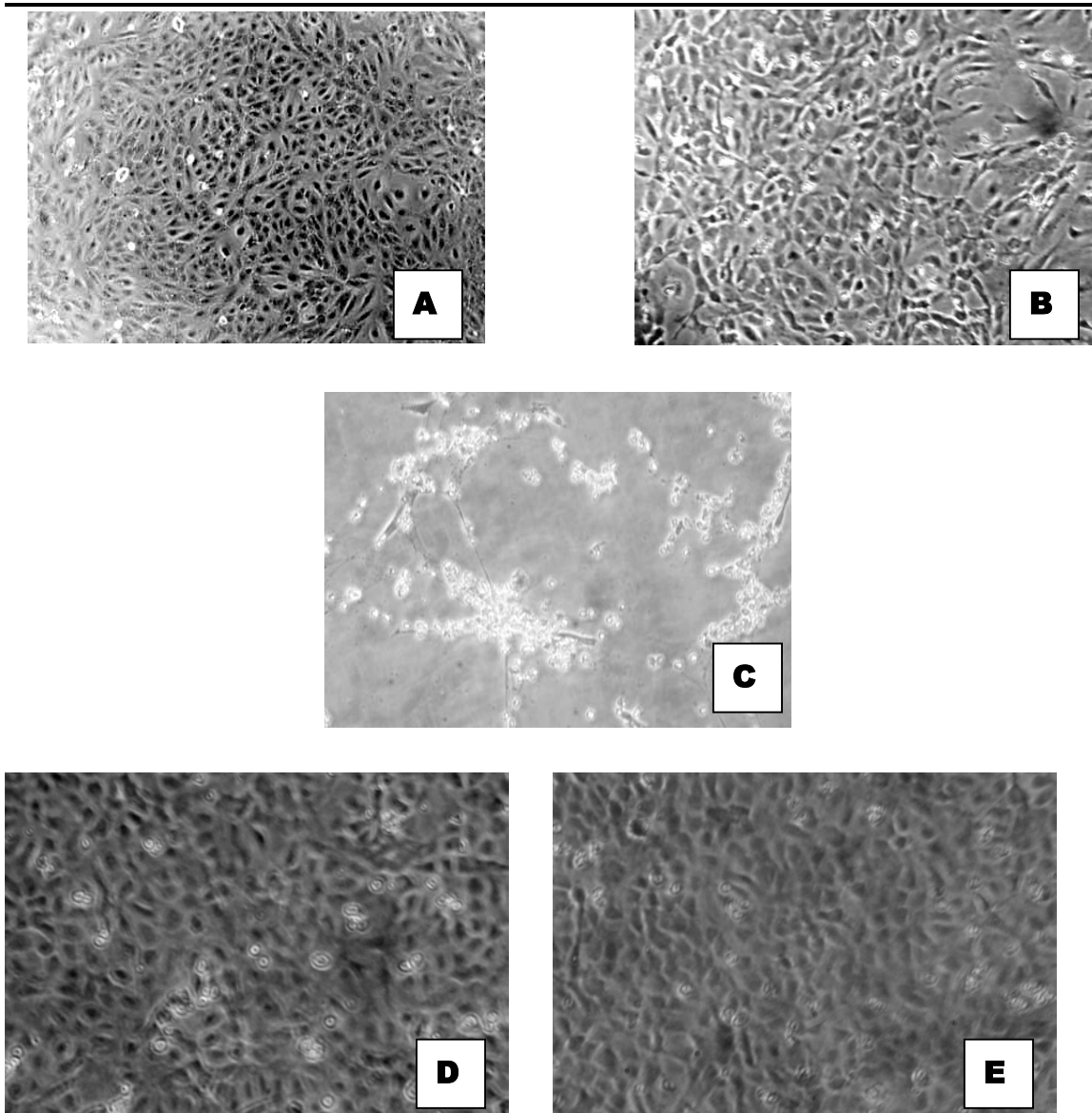


Figura 25. Células endoteliales en cultivo con medio M-199 (A), y células endoteliales después de 72 h de tratamiento con 10 ng/ml de TNF α (B), factores solubles de células tumorales ZR 75.30 (C), FST de MCF-7 (D) y FST de HeLa (E) cada uno de ellos a una concentración de 620 ng/ml en medio de cultivo M-199.

Al momento de adicionarles los tratamientos, las células endoteliales se encontraban semiconfluentes (aproximadamente un 80% de confluencia). En las imágenes anteriores podemos observar que cuando las células endoteliales se incubaron durante 72 h con los FST de las células MCF-7 y HeLa siguieron su proliferación hasta llegar al 100% de confluencia y a simple vista no sufrieron cambios en su morfología.

Las HUVECs que se mantuvieron en incubación con $TNF\alpha$ mostraron pequeños cambios en su morfología, algunas células se tornaron alargadas y el cultivo no muestra la confluencia que puede verse en las células mantenidas con medio de cultivo o con los FST de MCF-7 y HeLa.

Las células endoteliales incubadas con los FST de células ZR 75.30 no sobrevivieron. Esto sugiere que alguna proteína, o la combinación de éstas en los FST de las células ZR 75.30, pudiera ser citotóxico o inhibidor de la proliferación en las HUVECs a tiempos largos. No se realizó la observación a distintos tiempos antes de las 72 h, con lo que se pudiera conocer si este efecto de los FST ocurrió en un tiempo menor a las 72 h.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

No hace más de cinco años, en nuestro grupo de trabajo se han estandarizado estrategias experimentales que han servido como modelos para entender procesos relacionados con el cáncer, en particular el proceso metastásico. Uno de estos modelos es el ensayo de adhesión, con el que se pretende conocer, *in vitro*, los mecanismos que rigen la interacción entre las células endoteliales sanas y las células tumorales cuando se ponen en contacto.

A diferencia del trabajo con líneas de células endoteliales transformadas con proteínas virales como el antígeno T SV40 o las proteínas E6 y E7 del papilomavirus, las HUVECs ofrecen la oportunidad de trabajar con células humanas normales. Adicionalmente, los cultivos primarios de HUVECs han mostrado en diversos estudios tener un comportamiento semejante al de la vasculatura post-capilar, ya que es capaz de responder a diversos estímulos como el de las citocinas $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ o al LPS. Además, la obtención de HUVECs es un proceso relativamente económico y fácil de realizar (Nachman y Jaffe, 2004).

Durante el proceso metastásico, las células tumorales que han logrado desprenderse de la masa tumoral primaria y que han obtenido un fenotipo invasivo que las torna capaces de atravesar la lámina basal e intravasarse, viajan arrastradas por el torrente sanguíneo (Chambers *et al*, 2002 y Johnson, 2000). En el transcurso de estos eventos, las células tumorales liberan factores solubles, que si bien tienen la función de proporcionar a la misma célula tumoral un ambiente apto para su sobrevivencia, pueden también afectar a las otras células de su entorno; en este caso, a las células endoteliales que se encuentran recubriendo la microvasculatura capilar y post-capilar (Lang *et al*, 2006).

La activación endotelial está involucrada en procesos como la inflamación crónica y aguda, regulación del tono vascular, cascada de coagulación, trombosis y angiogénesis. En dichos procesos, la célula endotelial tiene la capacidad de producir moléculas diferentes cuya síntesis y expresión dependerá del estímulo y entorno al que se encuentren expuestas (Kumar *et al*, 1999). Esta propiedad de

activación por parte de las células endoteliales sirve de base para realizar los ensayos en donde las HUVECs son estimuladas con diversos factores con el fin de lograr un cambio del fenotipo constitutivo o de reposo en el que normalmente se encuentran, hacia un fenotipo activado. Si bien hay muchos marcadores moleculares de la activación endotelial, nosotros hemos elegido un ensayo funcional como la adhesión. Por tanto, hemos evaluado de forma indirecta la adhesión de células tumorales y hemos correlacionado la adhesión con la activación del sistema NF- κ B y la expresión de moléculas de adhesión.

En los últimos años, se ha llegado a considerar que los tumores aprovechan elementos de la respuesta inflamatoria para adherirse al tejido blanco, ya que se han observado células inflamatorias circundando al tumor y produciendo citocinas como el TNF α y la IL-1 β , entre otras (Brakebush *et al*, 2002).

La posibilidad de cultivar células *in vitro* ofrece la oportunidad de coleccionar los factores que liberan y estudiar los efectos biológicos de éstos. Por ejemplo, la activación *in vitro* de células U937 con LPS permitió coleccionar factores solubles que activan a las HUVECs, incrementando la expresión de moléculas de adhesión y la adhesión de monocitos. Estudios similares coleccionando los factores solubles de células derivadas de linfoma humano (EuHe) mostraron que aún sin ningún estímulo las células EuHe liberan factores que activan a las HUVECs. El grupo de Simiantonaki (2002) analizó la actividad biológica de factores solubles liberados por diversos carcinomas previamente estimulados con LPS, TNF α o IL-1 β , y demostró un incremento en la expresión de moléculas de adhesión en HUVECs en respuesta a estos factores solubles.

Al igual que en el trabajo de Estrada-Bernal (2003b), en la presente investigación se obtuvo un aumento en la adhesión de células tumorales a HUVECs y se observó una regulación positiva en las moléculas de adhesión selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1 en las HUVECs cuando fueron previamente estimuladas con los factores solubles que liberan las células tumorales de la línea de cáncer de glándula mamaria humana ZR 75.30.

Mientras que en los estudios de Estrada-Bernal no se trabajó con células metastásicas, en el presente trabajo se emplearon células tumorales humanas derivadas de tumores sólidos como es el caso del cáncer de glándula mamaria.

Como una nueva aportación, en este trabajo se evaluó la adhesión en sistemas homólogos (estimulación de HUVECs con FST de células ZR 75.30 y adhesión de ZR 75.30 a HUVECs pre-tratadas) y se comparó con sistemas heterólogos (estimulación de HUVECs con FST de células ZR 75.30 y adhesión de U937, MCF-7 o HeLa a las HUVECs pre-tratadas).

A diferencia con el trabajo de Simiantonaki y colaboradores (2002), los sobrenadantes que contienen los FST empleados en estos trabajos fueron obtenidos sin un tratamiento previo (de citocinas o LPS) de las células tumorales. Mostrando que por sí mismos, estos FST son capaces de modificar el fenotipo endotelial.

Los resultados presentados en este trabajo muestran que las células tumorales en ausencia de cualquier estímulo (citocinas o LPS) liberan factores solubles capaces de activar al endotelio. Por tanto, *in vivo*, los FST y las citocinas producidas por células del sistema inmune que frecuentemente rodean a los tumores podrían actuar en forma sinérgica, potenciando la invasividad de las células metastásicas.

LA ADHESIÓN BASAL

En el presente proyecto se estudió el comportamiento de células tumorales humanas de las líneas ZR 75.30, MCF-7 y HeLa. Las dos primeras son células de cáncer de glándula mamaria, con morfología epitelial y adherentes.

Las células ZR 75.30 provienen de un carcinoma ductal, se obtuvieron por primera vez de un sitio metastásico con ascitis y se caracterizan principalmente por la elevada producción de mucinas. La línea celular MCF-7 proviene de un adenocarcinoma y las células fueron originalmente obtenidas de una efusión pleural. MCF-7 comparte con ZR 75.30 la característica de expresar receptores a estrógenos pero, en particular, mantiene muchas características del epitelio mamario diferenciado; entre ellas la capacidad de procesar estradiol y de formar

domos. Clínicamente, las células ZR 75.30 tienen una capacidad más invasiva que las MCF-7, y es por esta razón que se emplearon estas dos líneas en este estudio para así comparar el comportamiento de un tipo celular más invasivo con uno menos invasivo.

En los ensayos de adhesión basal a la superficie plástica de las placas de cultivo, estas dos líneas celulares mostraron grandes diferencias. Durante los distintos tiempos en que se mantuvieron dichos ensayos se observó que las células MCF-7 tuvieron una gran capacidad de adhesión a la superficie de la placa de cultivo, llegando a un 41% del total de células sembradas a los 30 min de haber sido colocadas en la placa de cultivo. En este mismo tiempo, sólo se había adherido un 7.4% de las células ZR 75.30 (Ver Figuras 11 y 12). Las células ZR 75.30 necesitaron de 6 h para obtener un valor similar de adhesión.

La máxima cantidad de células MCF-7 adheridas fue cerca del 90%, que se obtuvo a las 3 h de haber sido sembradas, valor que nunca fue alcanzado por las células ZR 75.30 en ninguno de los ensayos. Por tanto, las células ZR 75.30 son 5 veces más lentas para adherirse a la placa de plástico que las MCF-7.

Este comportamiento por parte de ambas líneas celulares resulta interesante considerando que las células ZR 75.30 son más invasivas que las MCF-7, ya que se podría pensar que parte de esa mayor invasividad, que caracteriza a ZR 75.30, sea por su capacidad adhesiva. La capacidad adhesiva de ZR 75.30 no mostró ser diferente cuando la adhesión se evaluó sobre la monocapa endotelial en estado de reposo (Figura 15).

La diferencia de superficies sí tuvo relevancia para la adhesión de células MCF-7 (Tabla 3), las cuales mostraron mayor preferencia para adherirse a la superficie plástica que a la monocapa endotelial. Una posible explicación a ello es la carga iónica que ofrece la superficie plástica de la placa de cultivo, la cual posee una cubierta de poli-lisina que presenta cargas positivas. Probablemente, la membrana de las células MCF-7 presenta una mayor proporción de proteínas, proteoglicanos y glicolípidos con carga negativa con respecto a las otras dos líneas estudiadas.

La línea celular HeLa ha sido el modelo más extensamente utilizado para el estudio del cáncer, en este trabajo se emplearon células de esta línea como referencia del comportamiento de células no provenientes de un cáncer de glándula mamaria en los mismos experimentos. Las células HeLa también son de origen epitelial y adherentes, pero a diferencia de ZR 75.30 y MCF-7, provienen de un adenocarcinoma de cérvix. En cuanto a su comportamiento en los ensayos de adhesión basal, la línea celular HeLa mostró tener una mayor afinidad a la caja plástica de cultivo que el mostrado por las células ZR 75.30. Sin embargo, los niveles máximos en porcentaje de adhesión de HeLa (41.79%) fueron también menores comparados a los obtenidos con las células MCF-7 (89.94%) después de 3 h de haber sido sembradas. La adhesión de HeLa sobre la monocapa endotelial fue ligeramente mayor (48.54%) con respecto a su adhesión a la superficie plástica de la placa de cultivo (41.79%) sin que llegara a ser una diferencia significativa (Tabla 2). En ambas superficies HeLa se adhiere en mayor proporción que las células ZR 75.30.

Las células HeLa no se consideran metastásicas y aún así, su adhesión a la superficie plástica y a la monocapa endotelial fue mayor que la adhesión mostrada por ZR 75.30, por lo tanto estos datos refuerzan la idea de que el fenotipo invasivo de las células ZR 75.30 no se encuentra ligado a su capacidad de adhesión a una vasculatura en estado de reposo.

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LOS FST

Como se mencionó en la sección de resultados, aunque el procedimiento de obtención de los factores solubles tumorales se llevó a cabo de la misma manera, cada línea celular secretó al medio una cantidad distinta de proteína. Las células MCF-7 fueron las que secretaron al medio la mayor concentración de proteína (4.46 ng/ μ l) con respecto al secretado por las otras dos líneas celulares (1.64 ng/ μ l en los FST de ZR 75.30 y 1.24 ng/ μ l en los FST de HeLa). Y aún así, con los ensayos de adhesión se observó que la misma cantidad de proteína de los diferentes FST tuvo variaciones en la respuesta de las células endoteliales.

Se puede decir entonces que, independientemente de la cantidad total de proteína presente en los factores solubles de células tumorales, es el tipo de factores, su combinación y su cantidad relativa la que es responsable de la respuesta endotelial. A este conjunto particular de factores secretados por cada célula tumoral le hemos denominado *contexto de factores solubles*. Así es como explicamos que el contexto de factores solubles derivados de ZR 75.30 es capaz de provocar en HUVECs un cambio hacia el fenotipo activado, mientras que, el contexto de factores solubles de MCF-7 y de HeLa tuvieron una capacidad notablemente menor. Aunque el conocimiento del contexto de moléculas secretadas al medio por células tumorales es muy reducido, se ha encontrado la presencia de algunas interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11) (Bendre, *et al*, 2005), IFN γ , factores de crecimiento como VEGF (Kerbel, 2000), proteasas (MPM-9 y MPM-2) (Ray y Stetler-Stevenson, 1994), así como activadores e inhibidores de proteasas como PAI (Zhang *et al*, 2006). Estos resultados sugieren que la invasividad y la capacidad metastásica no están relacionadas a la cantidad de proteína que secretan las células tumorales.

Podríamos considerar también, que con el TNF α estamos dirigiéndonos a un receptor específico de éste en la membrana de las células endoteliales (TNFR1) al cual podemos saturar o no dependiendo de la concentración de citocina utilizada; en cambio, los FST representan un contexto de proteínas que puede incluir citocinas, factores de crecimiento u otras proteínas que pueden dirigirse a un número y tipos distintos de receptores, que a su vez promueven una respuesta endotelial distinta de la provocada con el uso únicamente del TNF α .

Es muy probable que una célula metastásica secrete una combinación de factores que pueda reproducirse en células tumorales del mismo origen. Sin embargo, de este panorama emerge la posibilidad de buscar combinaciones de citocinas y factores como marcadores biológicos de la capacidad metastásica de una célula tumoral.

EL MODELO DE ADHESIÓN HETERÓLOGA

Las células de mieloma U937 han demostrado ser un buen modelo para los ensayos de adhesión debido a que tienen la característica de ser no adherentes. La monocapa de HUVECs provee a las células U937 de una superficie adherente aún en su estado de reposo, pues en esta condición se obtuvo en promedio un 26.6% de adhesión. Sin embargo, cuando se co-incubaron células U937 con HUVECs en estado activado, el número de células U937 que se adhiere aumentó significativamente. El endotelio previamente tratado con $TNF\alpha$ o con los FST de células ZR 75.30 es más adherente para las células U937 (83 y 75% respectivamente) que cuando se encuentra sin un tratamiento previo. El tratamiento con los FST de células MCF-7 o HeLa no fue capaz de promover una adhesión mayor al control.

Se realizó un único ensayo de adhesión por triplicado estimulando a las HUVECs con los factores solubles de ZR 75.30 a una concentración menor y otra mayor a la usada en el resto de los ensayos. Se utilizó también una concentración menor de $TNF\alpha$ (5 ng/ml) (no se muestran los resultados). Esto fue para conocer si la adhesión de las células U937 o ZR 75.30 mostraba ser dependiente de la concentración de $TNF\alpha$ o FST de ZR 75.30. En este único experimento se observó que la adhesión de células U937 sí presenta un comportamiento dependiente de la concentración de estímulo usado sobre las HUVECs. En contraste, esto no ocurrió para la adhesión de células ZR 75.30, las cuales mantuvieron el mismo porcentaje de adhesión en las tres concentraciones de FST de ZR 75.30 utilizadas (320, 620 y 820 ng de proteína/ml). Para validar estos resultados, sería necesario repetir el experimento. Sin embargo, en el caso de obtener resultados similares en los que observemos una adhesión dosis-dependiente de U937 pero una adhesión constante con ZR 75.30, podríamos decir que en el caso de células U937, probablemente éstas sí expresan los contra-receptores apropiados para las moléculas de adhesión que el endotelio expresa como respuesta dosis-dependiente al tratamiento con los FST de ZR 75.30, mientras que las células ZR 75.30 carecen de los contra-receptores necesarios para incrementar su porcentaje de adhesión.

Con los ensayos heterólogos en donde se estimularon las HUVECs con los tres tipos de FST (ZR 75.30, MCF-7 y HeLa) y se evaluó la adhesión de los cuatro tipos de células tumorales (U937, ZR 75.30, MCF-7 y HeLa) se pudo observar que sólo los FST de células ZR 75.30 fueron capaces de promover la adhesión de células tumorales a las HUVECs; en este caso, provocando una respuesta endotelial que resultó en un fenotipo más adhesivo para las células de mieloma (U937) y de cáncer de glándula mamaria (ZR 75.30 y MCF-7) (Tabla 4), pero no así para las células de cáncer cervicouterino (HeLa).

Es importante resaltar que, con respecto a su adhesión basal, las células ZR 75.30 mostraron una mayor afinidad por el endotelio activado que el mostrado por las células MCF-7 o HeLa. Podemos hacer referencia entonces a las proteínas que se encuentran presentes en la membrana de las células ZR 75.30 y no en MCF-7 o HeLa, las cuales pueden ser contra-receptores a moléculas de adhesión expresadas por el endotelio. Aunque no existen muchos trabajos acerca de las moléculas de superficie expresadas por las células ZR 75.30, se ha documentado que las células ZR 75.30 entre otras, expresan en su membrana a la integrina VLA-4 (Budinsky, 1997), la cual es el contra-receptor de ICAM-1. En este sentido, esta característica de afinidad por una monocapa endotelial activada en las células ZR 75.30 puede ser una posible explicación a su mayor invasividad, ya que las células ZR 75.30 se adhirieron a las células endoteliales activadas tanto por la citocina $TNF\alpha$ como por los FST de células ZR 75.30, MCF-7 o HeLa, en mayor o menor proporción, pero sí de una manera significativamente diferente al porcentaje de adhesión a HUVECs sin previo estímulo (Figura 16).

Se logró demostrar entonces que el endotelio *in vitro* obtiene un fenotipo más favorable para adherir células tumorales ZR 75.30 cuando se estimula con FST de células más invasivas como ZR 75.30, que cuando es tratado con los FST de células menos invasivas como MCF-7. Los FST de células ZR 75.30 también fueron eficaces como activadores de HUVECs para adherir células U937 y MCF-7 en ensayos de adhesión heteróloga.

EL MODELO DE ADHESIÓN HOMÓLOGA

El tratamiento de las células endoteliales con los FST, intenta simular un posible fenómeno presentado en el microambiente del lecho vascular previo a la invasión metastásica de un órgano blanco, en donde los factores solubles secretados por el tumor pueden alcanzar al endotelio local y alterar su fenotipo, esto es, activándolo. La consecuente secreción de citocinas y quimiocinas, así como la posterior expresión de moléculas de adhesión por parte del endotelio, lo convertiría en una superficie adherente y apta para el reclutamiento celular. Sin embargo, todos los experimentos realizados en nuestro grupo, habían empleado células U937 como células adherentes. Por tanto aquí se modificó el modelo para analizar la adhesión homóloga, la activación endotelial provocada por los FST de un tipo de célula tumoral y posteriormente, evaluar la adhesión del mismo tipo de célula tumoral.

Los FST de células ZR 75.30 no sólo fueron eficaces como activadores de HUVECs para adherir células U937 y MCF-7 en ensayos de adhesión heteróloga sino que también mostraron su capacidad de promover la adhesión de las mismas células ZR 75.30 en ensayos de adhesión homóloga. Estos resultados nos sugieren que los FST de células ZR 75.30 fueron más efectivos para la activación endotelial. También se muestra que las mismas células ZR 75.30 fueron más afines a un endotelio activado que a la monocapa endotelial en reposo.

En el sistema de adhesión homóloga ni los FST de MCF-7, ni los FST de HeLa promovieron una adhesión mayor al control (Figura 19) a la concentración utilizada. Para poder concluir de manera más precisa que estos FST no tienen actividad, comparados con los de ZR 75.30, sería necesario i) incrementar la dosis de FST de MCF-7 o HeLa y ii) realizar los ensayos de adhesión a tiempos más cortos para disminuir la alta adhesión a HUVECs de ambas células.

CITOCINAS Y FACTORES SOLUBLES TUMORALES FAVORECEN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN HUVECs

Desde hace más de 150 años ha sido ampliamente estudiado el fenómeno inflamatorio así como los eventos de reclutamiento leucocitario que ocurren en las

células endoteliales durante éste y otras patologías asociadas. Sin embargo, sólo en las últimas décadas se han identificado moléculas activadoras, quimioatrayentes y de adhesión (Albelda *et al*, 1994).

En la expresión endotelial de moléculas de adhesión inducida por citocinas, las más estudiadas son selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1, debido a su participación secuencial en el reclutamiento leucocitario durante la inflamación.

En el presente trabajo se evaluaron los niveles de selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1 para conocer si los factores solubles derivados de células tumorales son capaces de inducir la expresión de estas CAMs en HUVECs y su posible participación en la adhesión que encontramos de células tumorales al endotelio activado con factores solubles tumorales.

LOS FST DE CÉLULAS ZR 75.30 PROMUEVEN LA EXPRESIÓN DE SELECTINA-E EN HUVECs

Cuando las HUVECs fueron tratadas con $TNF\alpha$, se observó un aumento de 15 veces en la expresión de selectina-E con respecto a la expresión basal, mientras que el tratamiento de las HUVECs con los factores solubles derivados de células ZR 75.30 provocó un aumento de 8 veces en la expresión de dicha molécula.

La intensidad relativa de fluorescencia (IRF) de células endoteliales que respondieron al tratamiento con los FST de células MCF-7 y HeLa no superaron el nivel basal de selectina-E, con lo que podemos decir que los FST de MCF-7 al igual que los FST de HeLa no tuvieron la capacidad de provocar la expresión de selectina-E en cultivos primarios de células endoteliales obtenidas de vena umbilical humana.

Se ha demostrado que algunas células tumorales expresan al carbohidrato sialyl-Lewis, el cual funciona como ligando para la molécula de selectina-E en el endotelio. La interacción de selectina-E con el sialyl-Lewis ha mostrado una participación importante en la adhesión al endotelio de células tumorales derivadas de órganos digestivos como el colon, así como de células cancerosas de páncreas y tracto biliar. También se ha encontrado al sialyl-Lewis como molécula

determinante en la adhesión de células de cáncer de glándula mamaria, ovario y pulmón (Ohyama *et al*, 1999). Estos datos sugieren que la adhesión de células cancerosas al endotelio mediada por selectina-E y su ligando carbohidratado específico, pueden estar involucrados fuertemente en la metástasis hematológica del cáncer.

La selectina-E ha sido descrita como una molécula que no se expresa de manera constitutiva en el endotelio. Sin embargo, en estudios *in vitro* se observa una baja expresión de esta molécula por parte de células endoteliales en reposo. En respuesta a estímulos pro-inflamatorios como $TNF\alpha$, $IL-1\alpha$ o $IL-1\beta$ hay un importante incremento de la expresión de selectina-E endotelial. Por tanto, el incremento en la expresión de selectina-E en HUVECs estimuladas con los FST de ZR 75.30 puede sugerirnos la presencia de alguna (s) de estas moléculas en los FST secretados por células de la línea ZR 75.30.

La adhesión de células tumorales al endotelio requiere la presencia de selectina-E endotelial así como de su ligando carbohidratado sobre las células tumorales; el grado de expresión de selectina-E sobre la pared vascular es un factor limitante para que la adhesión ocurra. En pacientes con cáncer de intestino se han encontrado niveles elevados de selectina-E en suero, lo cual ha sido relacionado con un mal pronóstico, sobre todo cuando las células tumorales expresan cantidades importantes de sialyl-Lewis. Esta misma correlación se ha encontrado en pacientes con cáncer de colon (Kannagi *et al*, 2004).

En general, los pacientes con cáncer presentan niveles elevados de selectina-E en suero (valores superiores a 35 ng/ml). En estudios inmunohistoquímicos de tejido de cáncer de colon, los pequeños vasos sanguíneos que rodean al tumor han mostrado frecuentemente la expresión de selectina-E, y tal expresión correlaciona inversamente con la distancia que estos vasos tienen con respecto al núcleo tumoral. Estos resultados sugieren la posibilidad de que las células tumorales, *per se*, tengan la habilidad de inducir la expresión de selectina-E (Kannagi *et al*, 2004). Nuestras evaluaciones *in vitro* tuvieron la finalidad de determinar la capacidad de los sobrenadantes de algunas células tumorales para inducir la expresión de

selectina-E en cultivos primarios de células endoteliales. Se ha demostrado que los factores producidos por células tumorales actúan sobre células inflamatorias, como los leucocitos mononucleares, promoviendo que éstos a su vez produzcan citocinas que inducen la expresión de CAMs en la vasculatura (Simiantonaki *et al*, 2002). Sin embargo, en este trabajo mostramos la inducción de la expresión de selectina-E endotelial mediada por los FST de células ZR 75.30 como respuesta directa que no necesita de células del sistema inmune. Consideramos ésta como una de las primeras evidencias de la capacidad activadora del endotelio mostrado por factores secretados por una línea de células de cáncer de glándula mamaria.

Existen otros factores que promueven un incremento en la expresión vascular de selectina-E, como las operaciones quirúrgicas, quimioterapia, radioterapia e infecciones oportunistas. También pueden expresarse otros tipos de selectinas que podrían estar participando en la adhesión de células tumorales al endotelio. Por tales motivos, la evaluación de la selectina-E así como de su ligando (sialyl-Lewis) en pacientes con cáncer, podría representar un método de diagnóstico complementario en la detección temprana de un proceso metastásico.

LOS FST DE CÉLULAS ZR 75.30 PROMUEVEN LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN ICAM-1 Y VCAM-1 EN HUVECs

En muchas ocasiones se ha caracterizado la activación de células endoteliales mediada por el $TNF\alpha$; dicha activación es principalmente evaluada por la sobreexpresión de ICAM-1 y por la expresión de VCAM-1. *In vivo*, la expresión de ambas moléculas de adhesión, junto con la expresión temprana de selectina-E, tienen una relevante participación secuencial en el proceso inflamatorio, pues estas moléculas son responsables del reclutamiento leucocitario (Remich y Friedland, 1997 y Madhavan *et al*, 2002).

Nuestro modelo de adhesión *in vitro*, pretende representar lo que acontece en las HUVECs cuando éstas son expuestas a factores solubles secretados por las células tumorales ZR 75.30, MCF-7 y HeLa con respecto a la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 como posibles mediadoras de la adhesión célula

tumoral-célula endotelial encontrada en los ensayos de adhesión realizados en este trabajo.

En las figuras 22 y 23 podemos observar que en los extractos totales de HUVECs mantenidas únicamente con el medio de cultivo M-199 hay una expresión basal de ambas moléculas de adhesión (lo cual se repitió en los tres experimentos independientes realizados para ICAM-1 y en tres de cuatro experimentos independientes realizados para VCAM-1). Sin embargo, se muestra un notorio incremento en la expresión de ambas moléculas cuando los tratamientos aplicados en HUVECs fueron el $\text{TNF}\alpha$ o los FST de las células ZR 75.30. Los FST de las células MCF-7 y HeLa no mostraron un efecto importante para inducir cambios en la expresión de ambas moléculas de adhesión sobre células HUVECs.

El papel de las moléculas de adhesión en el control de la arquitectura del tejido y el mantenimiento de su integridad es muy importante. Pero en el caso de los tumores, la participación de las moléculas de adhesión es muy diversa y compleja. Las alteraciones en la expresión de CAMs pueden ser relevantes tanto en el desarrollo del tumor como en su capacidad invasiva. El papel de las CAMs en el establecimiento de una metástasis aún es algo incierto. Las células metastásicas se encuentran con distintos entornos y algunos de ellos pueden dirigirlos hacia la evolución de la metástasis. Las CAMs, en algunos casos, mantienen los contactos intercelulares previniendo eventos de apoptosis o pueden también estar implicadas en la adhesión de las células metastásicas (Ilyas, 2000). Los mecanismos usados por los leucocitos para adherirse al endotelio activado proveen ideas acerca de cómo las células endoteliales interactúan con las células tumorales. Los leucocitos, así como probablemente las células tumorales, responden a las señales de activación y adhesión provistas por el endotelio. Estas señales resultan en la adhesión de los leucocitos a la pared vascular y en su posterior activación y trans migración al interior del tejido. Como se ha mencionado anteriormente, el primer paso en tal proceso involucra una rápida adhesión laxa del leucocito a la molécula de selectina-E, selectina-P o VCAM-1 expresada sobre la célula endotelial activada. Una vez que el leucocito está adherido al endotelio, sustancias

quimiotrayentes lo activan; permitiendo que el leucocito a su vez exprese moléculas que faciliten su adhesión firme a las moléculas VCAM-1 e ICAM-1 del endotelio. Las integrinas $\alpha 4$ y $\beta 2$ son los ligandos respectivos de VCAM-1 e ICAM-1, mientras que algunas sustancias quimioatrayentes conocidas por ejemplo en eosinófilos, pueden incluir citocinas tales como eotaxina, mediadores lipídicos como el factor activador de plaquetas y leucotrienos. Muchas de las moléculas de adhesión y activación expresadas por el endotelio activado, han sido también encontradas en la superficie de células tumorales. VCAM-1 por ejemplo, se ha encontrado en algunos mesoteliomas y en células epiteliales de carcinoma mamario. ICAM-1 por su parte, se expresa en endotelio tumoral así como en células tumorales de origen epitelial. Las líneas celulares de carcinoma mamario humano MDA-MB-435S y MDA-MB-468 son capaces de expresar ICAM-1 y VCAM-1 en su superficie, además de reclutar eosinófilos. Estas líneas celulares también liberan sustancias activadoras de eosinófilos incluyendo a la citocina CC RANTES luego de su exposición a $TNF\alpha$ (Ali *et al*, 2000). En el presente trabajo no se determinaron las CAMs o sus ligandos en las células tumorales y aún no se ha determinado la totalidad de los componentes de los FST. Los resultados preliminares de los ensayos tipo ELISA (Bio-Plex™ Cytokine Assays de Bio-RAD) realizados por la M. en BE. Delina Montes Sánchez en nuestro grupo de investigación, sugieren la presencia de citocinas activadoras del endotelio en los FST secretados por parte de las células ZR 75.30, MCF-7 Y HeLa, las cuales se muestran en la siguiente tabla.

Línea celular	Citocinas evaluadas en los FST (pg/ml) en 50 μ l de FST									
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IFN- γ	TNF α	IL-1 β	IL-12	IL-1ra
ZR	1.26	46.6	>34683	>35713	<0.65	2248	194.9	19.1	<2.2	91.4
MCF-7	54.9	<1.7	52.21	513.28	<0.65	11.52	5.85	2.18	<2.2	36.2
HeLa	<0.4	<1.7	134.4	202.16	<0.65	25.35	6.28	0.97	<2.2	10.3

IL= Interleucina, **IFN**= Interferón, **IL-1ra**= Receptor de IL-1

Algunos grupos de investigación han demostrado la presencia de $TNF\alpha$ y de las interleucinas 6 y 1β en la zona abdominal, principalmente posterior a una cirugía o trauma peritoneal, o en las zonas circundantes a tumores gastro-intestinales, por lo que se cree que estos factores no sólo afectan la zona más próxima al tumor sino que también pueden ejercer su efecto pro-inflamatorio en sitios distantes (Ten Kate *et al*, 2004). Los estudios *in vitro* han demostrado que la pre-incubación de células endoteliales de microvasculatura humana (HMVEC-L) con $TNF\alpha$ o con la IL- 1β incrementan significativamente la adhesión de células de carcinoma de colon HT29, lo cual no ocurre cuando la pre-incubación se lleva a cabo con IL-6. No ha sido determinado completamente cómo las células tumorales responden a las citocinas solubles. Probablemente las citocinas circulantes también regulan positivamente a las moléculas de adhesión sobre las células tumorales mediante las cuales la adhesión de las células tumorales al endotelio activado con citocinas pro-inflamatorias puede ser más eficiente (Ten Kate *et al*, 2004). Sin embargo, en nuestros experimentos hemos observado que las células tumorales sin un tratamiento previo con citocinas son capaces de adherirse al endotelio. Otro hallazgo importante en nuestro trabajo es la expresión temprana de ICAM-1 y VCAM-1 en HUVECs, ya que en el trabajo de Ten Kate y colaboradores (2004) la expresión de tales moléculas de adhesión en HMVEC-L fue evaluada después de 12 h de tratamiento con las citocinas. En el caso del trabajo de Simiantonaki (2002), aunque el tratamiento de HUVECs con LPS, $TNF\alpha$ o IL- 1β fue de 4 h, la evaluación de ICAM-1 se realizó 8 h después y 24 h después en el caso de VCAM-1. Por lo tanto, debemos considerar que probablemente no obtuvimos la sobre-expresión máxima de estas moléculas en las HUVECs estimuladas con los FST, pero observamos entonces que a partir de 3 h de tratamiento podemos detectar la sobre-expresión de estas moléculas de adhesión.

En el área de la metástasis y las moléculas de adhesión celular, falta aún mucho por estudiar, pues la adhesión de células tumorales al endotelio no se debe a la presencia de una única CAM sino a distintos complejos de CAMs como lo han

demostrado diversos estudios; todo depende del tipo de estímulo que afecte al endotelio y el tipo de célula tumoral que se adhiere. Sin embargo, las evidencias siguen aportando pruebas de la relación existente entre la respuesta inflamatoria y el proceso metastásico; y mientras más se desentrañen los mecanismos involucrados, mayores aportaciones se podrán brindar a los tratamientos para reducir los riesgos de metástasis o recurrencia y beneficiar por tanto la sobrevivencia y/o calidad de vida de los pacientes de cáncer.

LOS FACTORES SOLUBLES TUMORALES DERIVADOS DE CÉLULAS ZR 75.30 ACTIVAN LA VÍA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS

La activación del factor NF- κ B ha sido muy bien establecida como un evento regulador de los genes que codifican para citocinas, receptores de citocinas y moléculas de adhesión celular que dirigen las respuestas inmune e inflamatoria. Más recientemente, la activación del NF- κ B ha sido relacionada con múltiples aspectos de la oncogénesis, incluyendo el control de la apoptosis, el ciclo celular, la diferenciación y la migración celular. Se ha demostrado que la forma clásica de NF- κ B (p50-p65) se localiza en el núcleo celular de diversas líneas de cáncer de mama y en algunas células tumorales del mismo tipo, y que en ellas, los productos oncogénicos pueden mantener activo el sistema NF- κ B de una manera o vía independiente de las cinasas de los inhibidores de NF- κ B (IKK), en la cual no hay degradación de los inhibidores I κ Bs pero existe la expresión de productos de genes antiapoptóticos que pueden participar en la sobrevivencia celular (Baldwin, 2001 y Aggarwal, 2004).

En la figura 24 se puede observar que a los 20 min de incubación de las HUVECs con los FST de células ZR 75.30 el factor nuclear- κ B ha sido translocado al núcleo. Esto nos indica que alguna de las sustancias presentes en los FST de ZR 75.30, y más probablemente, el conjunto de ellos pueden activar el sistema NF- κ B. Es importante notar que los FST de MCF-7 y HeLa promovieron una discreta translocación de NF- κ B al núcleo, claramente visible por encima de los niveles

basales. Es posible que esta baja intensidad en la translocación no sea suficiente para activar la transcripción génica. Esto explicaría porqué con los FST de ZR 75.30 se obtuvo la expresión de CAMs vistas como genes que responden a NF- κ B y no con los FST de MCF-7 y HeLa. La importancia de este ensayo en el presente trabajo es precisamente valorar si la expresión de moléculas de adhesión inducida por factores solubles tumorales en células endoteliales es mediada por la vía de NF- κ B, ya que se ha descrito en diversas ocasiones la expresión de selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales mediante esta vía. La regulación transcripcional de selectina-E por ejemplo, es promovida por el TNF α activando la vía de señalización de NF- κ B. El gen de esta molécula se encuentra silenciado en las células endoteliales en reposo pero es rápidamente transcrito cuando las células endoteliales son activadas con TNF α o interleucina-1 β . La transcripción ocurre entre 1-2 h y regresa a los niveles basales 12 h después de la inducción. Estudios de unión al ADN revelaron que para la expresión de selectina-E se requiere de NF- κ B y de un pequeño grupo de otros activadores transcripcionales, de los cuales algunos contienen secuencias de reconocimiento de NF- κ B (Read *et al*, 1997). Injune y colaboradores demostraron que la expresión de selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 en HUVECs estimuladas con VEGF es mediada también por NF- κ B. Este mismo equipo encontró en un ensayo de super retardo que el VEGF activa a NF- κ B en HUVECs en la forma heterodimérica p50-p65 (Injune *et al*, 2001).

En nuestro ensayo de retardo podemos observar 2 distintos complejos de NF- κ B en los núcleos de HUVECs tratadas con TNF α o con los FST de ZR 75.30, esto nos sugiere por una parte, que los FST de células ZR 75.30 pueden promover la translocación del NF- κ B por una vía distinta a la activada por TNF α , o por otra parte nos sugiere que los FST de células ZR 75.30 activan la translocación al núcleo del factor NF- κ B mediante un complejo proteico distinto.

Diferentes tipos de heterodímeros pueden constituir al factor NF- κ B y ser activados por un diverso rango de estímulos. Esto resulta en la activación de una amplia variedad de moléculas; y mientras las funciones de NF- κ B en muchos de estos contextos han sido sujetos de intensas investigaciones que a la fecha se

consideran bien establecidos, es claro también que existe una gran diversidad en los efectos y consecuencias de la activación de NF- κ B. Las distintas formas heterodiméricas de NF- κ B no regulan necesariamente los mismos genes, tampoco lo hacen de manera idéntica y mucho menos lo hacen en las mismas circunstancias en las cuales fueron activadas (Perkins y Gilmore, 2006). Por tales motivos, a 20 años del descubrimiento del NF- κ B es necesario seguir estudiando la complejidad de su respuesta, sus distintos factores y rutas de activación, sus sinergismos y otras implicaciones. Y sobre todo, los mecanismos por los cuales es capaz de participar en eventos tan opuestos como lo son la sobrevivencia y la muerte celular.

CONCLUSIONES

* Los FST secretados por las células ZR 75.30 inducen en HUVECs un fenotipo capaz de adherir tanto a las células U937 como a las mismas células ZR 75.30. Los factores secretados por las células MCF-7 y HeLa no inducen adhesión significativa de las células U937, MCF-7 o HeLa a HUVECs.

* Las células HUVECs tratadas con FST de células ZR 75.30 son capaces de sobre-expresar las moléculas de adhesión selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1, mientras que, los FST de células MCF-7 y HeLa no indujeron la sobre-expresión de estas moléculas.

* La incubación de HUVECs con los FST de células ZR 75.30 promovió la translocación del NF- κ B. Esto sugiere que probablemente la expresión de moléculas de adhesión celular es mediada por la activación de la vía NF- κ B inducida por los FST de ZR 75.30.

* Los FST de MCF-7 y HeLa promovieron un discreto aumento en la translocación de NF- κ B al núcleo.

* Las células ZR 75.30 secretan *per se* factores solubles capaces de inducir la activación endotelial y promover su propia adhesión.

BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal** BB. (2004) Nuclear factor- κ B: The enemy within. *Cancer Cell* 6: 203-208
- Aggarwal** BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. (2006) Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochem Pharmacol* 30: 1605-1621
- Albelda** SM, Smith CW, Ward PA. (1994) Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 8: 504-512
- Alberts** B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002) *Molecular biology of the cell*. 4^a ed. Ediciones Garland, Nueva York.
- Ali** S, Kaur J, Patel KD. (2000) Intercellular Cell Adhesion Molecule-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1, and Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted Are Expressed by Human Breast Carcinoma Cells and Support Eosinophil Adhesion and Activation. *Am J Path* 157: 313-321
- Apte** RN, Krelin Y, Song X, Dotan S, Recih E, Elkabets M, Carmi Y, Duorkin T, White RM, Gayvoronsky L, Segal S, Voronov E. (2006) Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumor-host interactions. *European J Cancer* 42: 751-759
- Baldwin** AS. (2001) Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *J Clin Invest* 107: 241-246
- Bannerman** DD, Goldblum SE. (2003) Mechanism of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *A J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L899-L914
- Bendre** MS, Margulies AG, Walser B, Akel NS, Bhattacharrya S, Skinner RA, Swain F, Ramani V, Mohammad KS, Wessner LL, Martinez A, Guise TA, Chirgwin JM, Gaddy D, Suva LJ. (2005) Tumor-Derived Interleukin-8 Stimulates Osteolysis Independent of the Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand Pathway. *Cancer Res* 65: 11001-11009
- Birchmeier** W, Behrens J. (1994) Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochem Biophys Acta* 1198: 11-26
- Brakebusch** C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fässler R. (2002) Integrins in invasive growth. *J Clin Invest* 19: 999-1006
- Brener** W, Langer P, Oesh F, Edgell Cora-Jean S, Wieser RJ. (1995) Tumor cell endothelium adhesion in an artificial venule. *Analyt Biochem* 225: 213-219
- Budinsky** AC, Brodowicz T, Wiltschke C, Czerwenka K, Michl I, Krainer M, Zielinski CC. (1977) Decreased expression of ICAM-1 and its induction by tumor necrosis factor on breast-cancer cells in vitro. *Int J Cancer* 11: 1086-1090
-

Cardoso LS, Araujo MI, Goes AM, Pacifico LG, Oliveira RR, Oliveira SC. (2007) Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb Cell Fact* (in Press)

Carlos T, Kovach N, Schwartz B, Rosa M, Newman B, Wayner E, Benjamin C, Osborn L, Lob R, Harlan J. (1991) Human Monocytes Bind to Two Cytokine-Induced Adhesive Ligands on Cultured Human Endothelial Cells: Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule-1 and vascular Cell Adhesion Molecule-1. *Blood* 77: 2266-2271

Chaby R. (2004) Lipopolysaccharide-binding molecules: transporters, blockers and sensors. *Cell Mol Life Sci* 61:1697-1713

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. (2002) Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites. *Nature* 2: 563-572

Chen F, Castranova V, Shi X. (2001) New Insights into the Role of Nuclear Factor- κ B in Cell Growth Regulation. *Am J Pathol* 159: 387-397

Cohen Even-Ram, Maoz M, Pokroy E, Reich R, Katz Ben-Zion, Gutwein P, Altevogt P, Bar-Shavit R. (2001) Tumor cell invasion is promoted by activation of protease activated receptor-1 in cooperation with the α v β 5 integrine. *J Biol Chem* 276: 10952-10962

Crawford HC, Matrisian LM. (1994) Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis* 14: 234-245

Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin, SM. (1999) Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J Immunol* 162: 2341-6

Darnell J. y Lodish H. (1999) *Molecular Cell Biology*. 4^a ed. W.H. Freeman and Company, New York

Dejana E. (2004) Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5: 261-270

Dumitrescu RG, Cotarla I. (2005) Understanding breast cancer risk- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 9: 208-221

Estrada-Bernal A, Alcántara Meléndez MA, Mendoza Milla C, Ventura Gallegos JL, Sabanero LM, Zentella Dehesa A. (2003a) Acetyl salicylic acid impedes endothelial cell activation mediated by soluble products derived from a human lymphoma. *Rev Oncol (España)* 5: 381-387

Estrada-Bernal A, Mendoza-Milla C, Ventura-Gallegos JL, López-Bojórquez LN, Miranda-Peralta E, Arechavaleta-Velasco F, Vadillo-Ortega F, Sánchez-Sánchez L, Zentella-Dehesa A. (2003b) NF- κ B dependent activation of human endothelial cells treated with soluble products derived from human lymphomas. *Cancer Letters* 191: 239-248

- Fidler** IJ. (1990) Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 50: 6130-8
- Fukumura** D, Kashiwagi S, Jain RK. (2006) The role of nitric oxide in tumour progression. *Nature Rev, Cancer* 6: 521-534
- Gabay** C, Kushner I. (1999) Acute-phase proteins and other systemics responses to inflammation. *N Engl J Med* 340: 448-454
- Goepfert** C, Imai M, Brouard S, Csizmadia E, Kaczmarek E, Robson SC. (2000) CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. *Mol Med* 6: 591-603
- Goldsby** RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. (2004) *Inmunología* 5ª ed. McGraw Hill Interamericana. México, DF. 357-379
- Gupta** K y Zhang J. (2005) Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J* 81: 236-242
- Haier** J. y Nicolson G. (2001) The role of tumor cell adhesion as an important factor in formation of distant colorectal metastasis. *Dis Colon Rectum* 44: 876-884
- Hewett** PW. (2001) Identification of tumor-induced changes in endothelial cell surface protein expression: an in vitro model. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 325-335
- Ilyas** M. (2000) Adhesion molecule expression in breast cancer: the phoenix in tumour metastasis? *J Pathol* 190: 3-5
- Injune** Kim, Sang-Ok Moon, Sung Hoon Kim, Hyung Jin Kim, Young Soon Koh, Gou Young Koh. (2001) Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear Factor- κ B Activation in Endothelial Cells. *J Biol Chem* 276: 7614–7620
- Jin** H y Varner J. (2004) Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Brit J Cancer* 90: 561-565
- Johnson** JP. (2000) Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Met Rev* 18: 345-357
- Kakinuma** T y Hwang ST. (2006) Chemokines, chemokines receptors, and cancer metastasis. *J Leuko Biol* 79: 639-651
- Kannagi** R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N. (2004) Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci* 95: 377-384
- Kerbel** RS. (2000) Tumor angiogenesis: Past, Present and the Near Future. *Carcinogenesis* 21: 505-515
- Krause** T y Turner GA. (1999). Are selectins involved in metastasis? *Clin & Exper Metast* 17: 183-192
-

Krump-Konvalinkova V, Kleideiter E, Friedrich U, Klotz U, Kirkpatrick CJ. (2003) Tumorigenic conversion of endothelial cells. *Exper Mol Pathol* 75: 154-159

Kuldo JM, Ogawara KI, Werner N, Ásgeirsdóttir SA, Kamps JAAM, Kok RJ, Olema G. (2005) Molecular Pathways of Endothelial Cell Activation for (Targeted) Pharmacological Intervention of Chronic Inflammatory Diseases. *Curr Vascular Pharmacol* 3: 11-39

Kumar V, Cotran R y Robbins S. (1999) *Patología Humana*. Editorial McGraw Hill, 6ª edición. México, D.F.

Lang K, Entschladen F, Weidt C, Zaenker KS. (2006) Tumor immune escape mechanism: impact of the neuroendocrine system. *Cancer Immunol Immunother* 55: 749-760

Lewin B. (2000) *Genes VII*. Oxford University Press.

Loeb KR y Loeb LA. (2000) Significance of Multiple Mutations in Cancer. *Carcinogenesis* 21: 379-385

López-Bojórquez LN, Zentella DA, Reyes TG. (2004) Molecular Mechanism Involved in the Pathogenesis of Septic Shock. *Arch Med Res* 35: 465-479

Lu H, Ouyang W, Huang C. (2006) Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Mol Cancer Res* 4: 221-233

Madge LA, Pober JS. (2001) TNF Signaling in Vascular Endothelial Cells. *Exp Mol Pathol* 70: 317-325

Madhavan M, Srinivas P, Abraham E, Ahmed I, Vijayalekshmi NR, Balaram P. (2002) Down Regulation of Endothelial Adhesion Molecules in Node Positive Breast Cancer: Possible Failure of Host Defence Mechanism. *Pathol Oncol Res* 8: 125-128

Mantovani A, Garlanda C. (2001) Endothelial Cells: Immunological Aspects. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group. 1 -7

Mantovani A, Sozzani S, Introna M. (1997) Endothelial Activation by Cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 832: 93-116

Mao S, Maeno N, Yoshiie K, Matayoshi S, Fujimura T, Oda H. (2002) CD14-mediated induction of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 by a heat-resistant constituent of *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. *Scand J Immunol* 56: 484-491

Michiels C. (2003) Endothelial cell functions. *J Cell Phys* 196: 430-443

Moldovan L, Moldovan NI, Sohn NH, Parikh SA, Goldschmidt-Clermont PJ. (2000) Redox changes of cultured endothelial cell and actin dynamics. *Circ Res* 86: 549-57

Mueller MM. (2006) Inflammation in epithelial skin tumours: Old stories and news ideas. *Eur J Cancer* 42: 735-744

Nachman RL, Jaffe EA. (2004) Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. *J Clin Invest* 14: 1037-1040

Ohyama C, Tsuboi S, Fukuda M. (1999) Dual roles of sialyl Lewis X oligosaccharides in tumor metastasis and rejection by natural killer cells. *EMBO J* 18: 1516–1525

Okegawa T, Li Y, Pong R, Hsieh J. (2002) Cell Adhesion Proteins as tumor suppressors. *J Urol* 167: 1836-1843

Okegawa T, Pong R, Li Y, Hsieh J. (2004) The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol* 51: 445-457

Perkins ND, Gilmore TD. (2006) Good cop, bad cop: the different faces of NF- κ B. *Cell Death Differ* 13: 759-772

Pober JS, Cotran RS. (1990) Cytokines and Endothelial Cell Biology. *Physiol Rev* 70: 427-451

Pober JS. (2002) Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res* 4 (suppl.3) S109-S116

Ray JM, Stetler-Stevenson WG. (1994). The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 7: 2062-2071

Read MA, Whitley MZ, Gupta S, Pierce JW, Best J, Davis RJ, Collins T. (1997) Tumor Necrosis Factor α -Induced E-selectin Expression Is Activated by the Nuclear Factor κ B and c-JUN N-terminal Kinase/p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathways. *J Biol Chem* 272: 2753-2761

Remick DG, Friedland JS. (1997) Cytokines in Heart and Disease, Chapter 22. 2nd edition New York.

Risau W. (1995) Differentiation of endothelium. *FASEB J* 9: 926-933

Rosales C, O'Brien V, Kornberg L, Juliano R. (1995) Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim Biophys Acta* 1242: 77-98

Ruoslahti E. (1996) How Cancer Spreads. *Scientific Am.* September 72-77

Schleef RR, Bevilacqua MP, Sawdey M, Gimbrone MA, Loskutoff DJ. (1988) Cytokine Activation of Vascular Endothelium. *J Biol Chem* 263: 5797-5803

Sheetz MP, Felsenfeld D, Galbraith CG, Choquet D. (1999) Cell migration as a five-step cycle. *Biochem Soc Symp* 65: 223-243

Simiantonaki N, Jayasinghe C, Kirkpatrick CJ. (2002) Effect of Pro-inflammatory Stimuli on Tumor Cell-Mediated Induction of Endothelial Cell adhesion Molecules in Vitro. *Exper Mol Pathol* 73: 46-53

Sunil AD. (2001) Towards a rational development of anti-endotoxin agents: novel approaches to sequestration of bacterial endotoxins with small molecules. *J Mol Recognit* 14: 370-387

Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. (1995) The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9: 866-873

Ten Kate M, Hofland LJ, Van Grevenstein WMU, Van Koetsveld PV, Jeekel J, Van Eijck CHJ. (2004) Influence of Proinflammatory Cytokines on the Adhesion of Human Colon Carcinoma Cells to Lung Microvascular Endothelium. *Int J Cancer* 112: 943- 950

Toborek M, Hennig B. (1996) Is endothelial cell autocrine production of tumor necrosis factor a mediator of lipid-induced endothelial dysfunction? *Med Hypotheses* 47: 377-82

Ulevitch RJ, Tobias PS. (1999) Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 11: 19-22

Unger RE, Krump-Konvalinkova V, Peters K, Kirkpatrick CJ. (2002) In Vitro expresión of the Endotelial Phenotype: Comparative Study of Primary Isolated Cells and Cell Lines, Including the Novel Cell Line HPMEC-ST1.6R *Microvascular Res* 64: 384-397

Van Horsen R, Ten Hagen TML, Eggermont AMM. (2006) TNF- α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *Oncologist* 11: 397-408

Vladova GM. (2002). Expression of cell adhesion molecules, their ligands and tumor necrosis factor α in the liver of patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *Histochem J* 34: 67-77

Weeb C. y Vande WG. (2000). Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *J Neuro-Oncol* 50: 71-87

Weiss L. (2000a) Some cell interactions. *Cancer Metast Rev* 19: 235-255

Weiss L. (2000b) Cell and tissue movements, invasion and angiogenesis. *Cancer Metast Rev* 19: 257-279

Yokota J. (2000) Tumor Progression and metastasis, *Carcinogenesis* 21: 497-503

Yoshimura A. (2006) Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci* 97: 439-447

Zhang X, Shu X, Cai Q, Ruan Z, Gao Y, Zheng W. (2006) Functional Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Variants and Breast Cancer Survival. *Clin Cancer Res* 12: 6037-6042

Importancia del LPS y la polimixina B en el proyecto

En el proceso de obtención de los factores solubles tumorales (FST) existe una serie de pasos en los que la manipulación de las soluciones las vuelve susceptibles a una contaminación bacteriana. Se sabe que las bacterias Gram negativas poseen en su membrana externa un lipopolisacárido (LPS) que puede ser liberado durante la duplicación o al momento de la muerte de la bacteria. El LPS es una molécula capaz de inducir una serie de respuestas celulares, principalmente en células del sistema inmune, lo que resulta en la producción de citocinas mediadoras de la inflamación, las cuales a su vez amplifican dicho proceso (Sunil, 2001). Se ha reportado que en células HUVECs, el LPS induce la expresión de IL-8 y proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) (S.Mao *et al*, 2002). El LPS induce también la producción de $\text{TNF}\alpha$ y óxido nítrico en macrófagos (Chaby, 2004) ya que participa en la translocación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ al núcleo celular (Ulevitch y Tobias, 1999).

La polimixina B es un antibiótico aislado de *Bacillus polymyxa* y es muy conocido por actuar como inhibidor de los efectos del LPS (Cardoso *et al*, 2007), por tal motivo se utilizó este antibiótico en todos los experimentos realizados con los FST para corroborar que fueron los FST quienes activaron el endotelio en los ensayos de adhesión y no fueron falsos positivos causados por la endotoxina bacteriana LPS.

Para conocer si el LPS a una concentración de 100 UE (unidades de endotoxina) podía inducir alguna de las respuestas que se evaluaron en este proyecto y si la polimixina B era capaz de abatirlas, se realizó un ensayo de adhesión y un inmunoanálisis de la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1). En el primero se observó que los niveles de adhesión de las células ZR 75.30 y U937 a HUVECs activadas con 620 ng/ml de los FST de ZR 75.30 no difieren de los niveles de adhesión provocados cuando las HUVECs se activaron con los FST de ZR 75.30 pre-tratados por 45 min con 10 $\mu\text{g/ml}$ de polimixina B.

No fue posible observar un incremento en la adhesión de células ZR 75.30 al endotelio activado con LPS ni inhibición alguna de esta adhesión luego del pre-tratamiento con polimixina-B ya que los niveles obtenidos fueron semejantes a

lo que se muestra como adhesión control, por ello se realizaron otros ensayos con distintas concentraciones de la endotoxina (cuyos resultados no se muestran) sin encontrar nuevamente diferencias con respecto a la adhesión basal. El número de células U937 adheridas al endotelio activado con LPS se incrementó 5.3 veces con respecto al control, pero esta adhesión fue abatida cuando el medio que contenía LPS fue pre-tratado por 45 minutos con polimixina B antes de adicionarlo a las HUVECs (Figura 26). El efecto activador del LPS e inhibidor de la polimixina B sobre HUVECs fue confirmado con estos ensayos.

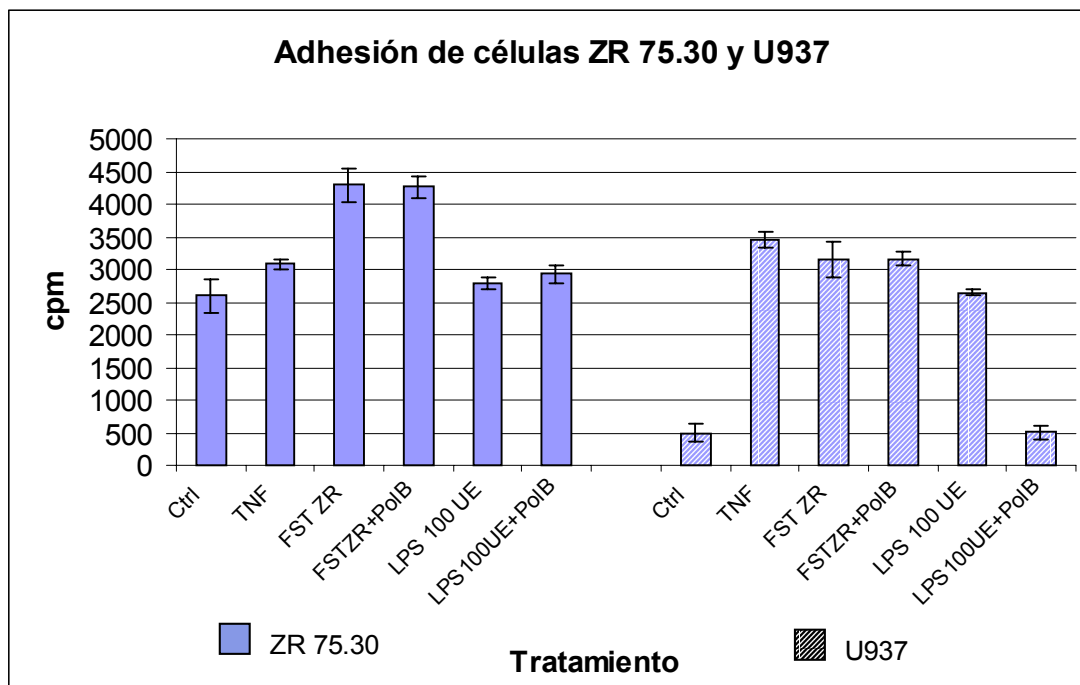


Figura 26. Gráfica que muestra en cpm (cuentas por minuto) los niveles de adhesión de células ZR 75.30 y U937 a HUVECs activadas con distintos tratamientos: control (Ctrl), que corresponde sólo al medio de cultivo M-199, 10 ng/ml de $TNF\alpha$, 620 ng/ml de FST de ZR 75.30, esta misma concentración de FST de ZR 75.30 pero con un pre-tratamiento de 45 min con polimixina B (PolB), 100 unidades de la endotoxina LPS y 100 UE de LPS también con un tratamiento previo con polimixina B. Se utilizaron 10 μ g/ml del antibiótico, todas las preparaciones fueron en medio M-199 y la co-incubación se llevó a cabo durante 3 h. Promedio de 2 experimentos independientes, cada uno por triplicado. Se muestra el error estándar.

Estos resultados pueden sugerir diferencias importantes entre las células ZR y U937 en cuanto al tipo y cantidad de moléculas de superficie que expresan, como por ejemplo receptores para las CAMs expresadas por las HUVECs que

tienen relevancia en este proyecto. En este aspecto, las células U937 a pesar de su origen linfoide, conservan muchas características monocíticas, donde son en general las moléculas de la familia de las integrinas quienes encuentran su ligando en las CAMs de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresadas en el endotelio. Por su parte, aunque se ha reportado la expresión de VLA-4 (una integrina) en las células ZR entre otras (Budinsky *et al*, 1997), no existen muchos reportes acerca de las moléculas de superficie expresadas por estas células.

En cuanto al inmunoanálisis realizado, se observó una respuesta dosis-dependiente en la expresión de selectina-E al estimular las HUVECs con 1, 10 y 100 UE LPS y fue notable que el efecto de las tres concentraciones empleadas de LPS se abatió completamente con 10 μ g/ml de polimixina B, por lo tanto esta misma concentración fue utilizada en todos los ensayos realizados en el proyecto.

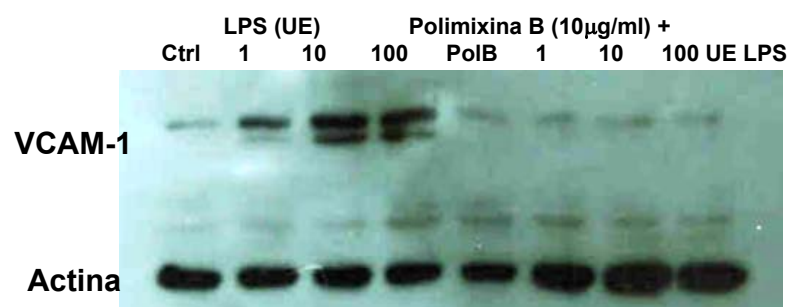


Figura 27. Inmunoanálisis donde se muestra la expresión de VCAM-1 en HUVECs tratadas por 3 horas con tres concentraciones de LPS (1,10 y 100 UE) y estas mismas concentraciones de LPS tratadas previamente con 10 μ g/ml de polimixina B.

Una vez confirmado el efecto de la polimixina B para abatir algunos de los efectos de la endotoxina bacteriana LPS, se realizaron los ensayos pertinentes para evaluar la inducción de la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales tratadas con los distintos factores solubles tumorales.

SOLUCIONES

MEDIOS DE CULTIVO	
RPMI con o sin rojo fenol	M-199 suplementado
1ml/L de antibiótico-antimicótico 5% de SFB y 5% de suero de ternera	200 mM L-glutamina 0.1 mg/ml de mitógeno endotelial 0.1 mg/ml de heparina

ENZIMAS	
COLAGENASA TIPO IV (GIBCO)	TRIPSINA (SIGMA)
0.2 g en 1 L en HEPES 1X Esterilizar por filtrado Preferentemente preparar y usar al momento	1 g en 1 L de Solución de verseno Esterilizar por filtrado Alicuotar y mantener en congelación Descongelar una alícuota para su uso y mantener en refrigeración

AMORTIGUADORES	
PBS (1 L)	NaCl 8g KCl 0.2g KH ₂ PO ₄ 0.2g Na ₂ HPO ₄ anhidro 2.16g pH 7.2-7.4
TBS (2 L)	NaCl 17.53g Tris 4.844g pH 7.5
TBE (1X) AMORTIGUADOR DE CORRIDA PARA EMSA	Tris 89 mM Ácido bórico 89 mM EDTA 2 mM pH 8.0
HEPES 20x (1 L)	NaCl 166g KCl 6.6g HEPES 52.3g Glucosa 44g La glucosa es sensible al calor, esterilizar por filtrado
VERSENO	NaCl 136 mM Tris 28 mM KCl 5.36 X 10 ⁻³ mM EDTA 5.26 X 10 ⁻⁴ mM pH 7.7
AMORTIGUADOR DE CORRIMIENTO PARA PROTEÍNAS 10X (2 L)	Glicina 288g Tris 61.11g SDS 20g pH 8.3
AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS (2 L)	Glicina 29g Tris 6g Metanol 200ml Agua 1800 ml
AMORTIGUADOR DE LISIS PARA PROTEÍNAS	Tris-HCl pH 8.0 50 mM NaCl 120 mM NP-40 (IGEPAL) 0.5% NaF 100 mM (stock 1M) NaVO ₅ 200μM (stock 20mM) PMSF 1 mM (stock 100 mM) Aprotinina 2-10 μg/ml (SIGMA 4°C) Leupeptina 10μg/ml (stock 5 mg/ml)

AMORTIGUADOR A PARA OBTENCIÓN DE NÚCLEOS			
	[FINAL]	[STOCK]	PARA 25 ml
HEPES pH 7.9	10 mM	1 M	250 μ l
KCl	10 mM	3 M	83.3 μ l
MgCl ₂	1.5 mM	200 mM	187.5 μ l
H ₂ O			24.47 ml
DTT	1 mM	1 M	Agregar 1 μ l/ml justo antes de usar

AMORTIGUADOR C PARA OBTENCIÓN DE PROTEÍNA PEGADA AL DNA			
	[FINAL]	[STOCK]	PARA 25 ml
HEPES pH 7.9	20 mM	1 M	500 μ l
NaCl	0.4 mM	1 M	10 ml
MgCl ₂	1.5 mM	200 mM	187.5 μ l
Glicerol	25 %	100 %	6.25 ml
EDTA	0.2 mM	250 mM	20 μ l
H ₂ O			8.23 ml
DTT	1 mM	1 M	Agregar 1 μ l/ml justo antes de usar
PMSF	0.5 mM	100 mM	Agregar 5 μ l/ml justo antes de usar

AMORTIGUADOR D PARA DILUCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA PROTEÍNA			
	[FINAL]	[STOCK]	PARA 20 ml
HEPES pH 7.9	20 mM	1 M	400 μ l
KCl	0.4 mM	3 M	330 μ l
Glicerol	20 %	100 %	4 ml
EDTA	0.2 mM	250 mM	16 μ l
H ₂ O			15.25 ml
DTT	1 mM	1 M	Agregar 1 μ l/ml justo antes de usar
PMSF	0.5 mM	100 mM	Agregar 5 μ l/ml justo antes de usar

ABREVIATURAS I

CAMs	Moléculas de adhesión celular
CEs	Células endoteliales
CM	Células metastásicas
CT	Células tumorales
EMSA	Ensayo de retardo en la movilidad electroforética
EuHe	Células humanas obtenidas de paciente con linfoma de Hodgkin
Eusebia	Células obtenidas de ratones inyectados con EuHe
FST	Factores solubles tumorales
HeLa	Línea celular humana derivada de cáncer de cérvix
HUVECs	Células endoteliales derivadas de vena umbilical humana
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN γ	Interferón gama
IL-	Interleucina
IRF	Índice relativo de fluorescencia
MCF-7	Línea celular humana derivada de adenocarcinoma mamario
MEC	Matriz extracelular
NF- κ B	Factor nuclear de la cadena kappa de las inmunoglobulinas de células B
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
U937	Línea celular de mieloma humano
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares-1
ZR 75.30	Línea celular humana derivada de cáncer de glándula mamaria con alto potencial invasivo

ABREVIATURAS II

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Bcl-xL	Proto-oncogen humano regulador de la apoptosis
BRMS1	Supresor 1 de la metástasis de cáncer de seno
CCL21	Quimiocina (motivo C-C) ligando 21
CCR7	Quimiocina (motivo C-C) receptor 7
CIAP	Proteína C inhibidora de apoptosis
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
COX	Ciclo-oxigenasa
CTLs	Linfocitos T Citotóxicos
CXCL12	Quimiocina (motivo C-X-C) ligando 12
CXCR4	Quimiocina (motivo C-X-C) receptor 4, también llamada fusina
FasL	Ligando Fas (Miembro 6 de la superfamilia TNF)
FGF	Factor de crecimiento de Fibroblastos
Flt-1	Cinasa 1 de tirosina relacionada a fms
FSIS	Factores Solubles Inmunosupresores
KDR	Dominio del receptor de inserción de cinasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LFA	Antígeno de superficie CD2
LPS	Lipopolisacárido
MadCAM-1	Molécula de adhesión de la adreína de células de la mucosa vascular-1
MCP-3	Quimiocina (motivo C-C) ligando 7, también conocida como CCL7
MIP-1 β	Proteína Inflamatoria de los Macrófagos
MPA	Maquinaria procesadora de antígenos
MPM(s)	Metaloproteinasa(s) de Matriz
PAF	Factor activador de plaquetas
PECAM-1	Molécula de adhesión de células endoteliales-plaquetas-1
PGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
RANTES	Quimiocina (motivo C-C) ligando 5 o CCL5
TGF α	Factor de crecimiento Transformante alfa
TGF β	Factor de crecimiento Transformante beta
VEGF	Factor de crecimiento del Endotelio Vascular
VM	Vesículas de Membrana
vWF	Factor o proteína de von Willebrand
XIAP	Proteína X inhibidora de apoptosis