



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

&

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SZ

***“ANÁLISIS DE MARCADORES DE SUPERFICIE EN
CÉLULAS ENDOTELIALES TRATADAS CON FACTORES SOLUBLES
DERIVADOS DE CÉLULAS TUMORALES”***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M en BE. DELINA GUADALUPE MONTES SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

COMITÉ TUTOR: DRA. CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

DR. GUILLERMO MENDOZA HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2010



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.

1. Datos del Alumno

Montes
Sánchez
Delina Guadalupe
55 11 75 29 72
Universidad Nacional Autónoma de México
Posgrado en Ciencias Biológicas
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Doctorado en Ciencias
504008814

2. Datos del tutor

Dr.
Alejandro
Zentella
Dehesa

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Diego
González
Halphen

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Clorinda
Arias
Álvarez

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Sergio
Encarnación
Guevara

6. Datos del sinodal 4

Dr.
José
Vázquez
Prado

7. Datos del sinodal 5

Dr.
Guillermo
Mendoza
Hernández

8. Datos del sinodal 6

Dr.
Felipe
Vadillo
Ortega

9. Datos del trabajo escrito

Análisis de marcadores de superficie en células endoteliales tratadas con factores solubles derivados de células tumorales

116 p.

2010

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la UNAM, que me abrió sus puertas sin reparos para mi superación académica y a la vez, abrió mi mente y me dio otras perspectivas de la vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por las becas: 162603 y 504008814, respectivamente, otorgadas durante el desarrollo del proyecto.

A las instituciones que dieron los apoyos financieros otorgados para la realización del proyecto: PAPIIT IN229607 y CONACyT 45519M.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, mi tutor, la persona que ha creído en mí desde el principio y, que me ha dado de las más importantes lecciones académicas y personales que he recibido en mi vida.

Al Dr. Guillermo Mendoza Hernández, miembro de mi comité tutorial y al cual le agradezco enormemente su interés por el proyecto y, el aporte de sus profundos conocimientos, estoy segura que sin su opinión objetiva, el desarrollo del proyecto no sería tan satisfactorio cómo lo es.

A la Dra. Clorinda Arias Álvarez, miembro también de mi comité tutorial, que siempre fue amable y me brindó confianza en los momentos de nervios. Gracias por todas sus sugerencias para el avance del proyecto y por su optimismo.

Al M en C. José Luis Ventura, que desde que inicié mis pasos en el área de investigación, ha sido mi amigo y mi maestro, ha compartido conmigo sus conocimientos, me ha ayudado a adquirir esa destreza experimental fundamental y, ha sido un apoyo fundamental en todo lo que se ha hecho de este proyecto.

Al Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, que me integró a laborar en su grupo de investigación estos últimos años y que siempre me brindó libertad y su apoyo para llevar a cabo mi trabajo a la par que terminaba con este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Al *Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"*, en el cual terminé el desarrollo del proyecto y conocí buenas amigas como: la Sra. Manuela, Aracely, Carmita, Greta y Edith.

Al *Instituto de Investigaciones Biomédicas* de la UNAM, que ha sido un apoyo fundamental para la obtención del grado, principalmente con la ayuda en la parte administrativa de Bety.

Al *Instituto de Fisiología Celular* de la UNAM, en el cual inicié con el desarrollo del proyecto y conocí también buenos amigos como la Dra. Rocio Alcántara, la Sra. Rocio Camarillo, Raúl Zárate, Javier Gallegos, Juan Barbosa e Ivette Rosas.

Al *Instituto Nacional de Cancerología*, en el cual he estado laborando los últimos años y que además de brindarme estabilidad económica, me ha dado flexibilidad y libertad para que terminara este proyecto.

A todos los integrantes del *Departamento de Bioquímica del INCMNSZ*, especialmente Adrián, César, Ambar, Marco, Fernando, con quienes he pasado innumerables buenos momentos de conversación y de diversión.

A los integrantes del laboratorio que han emprendido sus caminos lejos de nosotros, pero que me dejaron lindos y divertidos recuerdos para llevar en la memoria por siempre: Adriana Estrada, Lucia López, Criselda Mendoza, Catalina Machuca, Josué Ruíz, Nohemí Barraza, Héctor Maya, Gaby Galicia.

A todos los integrantes del *Laboratorio de Carcinogénesis del INCan*, que me han brindado su amistad y con quienes he compartido muchas comidas, reuniones, partidos de futbol en fin ¡muchas cosas buenas! Especialmente con mucho cariño a Marco, Rodrigo, Julia, Clemen, Alex, Miguel y Didier.

A mis amigas *Aimée Domínguez, Irma Mitre y Susana Frías*, que han compartido codo a codo conmigo, cuando las cosas personales y académicas han ido bien y/o mal. Gracias por escucharme y por darme siempre su opinión en esos momentos de alegría o desesperación, porque su compañía ha sido básica para mí en este adorable y difícil camino científico.

A mis amigas *Rosario Morales y Verónica Paz*, que a pesar de la distancia y del tiempo siempre están ahí cuando las necesito, apoyándome, escuchándome, deseándome suerte.

Finalmente, muchas gracias a todas las personas que en este tiempo se han cruzado en mi camino y me han hecho mucho más agradable este proceso de aprendizaje.

DEDICATORIAS

A mi abuela *Lotte Fitzner* y a mi madre *Erika Sánchez*.

Que a pesar de no comprender muchas veces la vida que he escogido, lo único que les ha importado es verme contenta con mi decisión. Gracias por haberme dado una familia amorosa y de buenos sentimientos, que nunca me ha dejado sola.

A *Juan Carlos Corona*.

Mi compañero constante en todo este tiempo de esfuerzo, que con su amor ha llenado esa parte personal fundamental de mi vida. Gracias por tus palabras de cariño en los buenos y malos momentos y también por las palabras severas que me han ayudado a mantenerme en el camino.
Gracias por todo.

A todos los miembros de mi familia: tíos, tías, primos, primas, sobrinos y sobrinas.

Especialmente a: Rodolfo, Ildefonso, Ylse y Elena, porque han sido como mis hermanos y por todos los bonitos recuerdos que tenemos juntos.

Índice

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	2
Abstract.....	4
Introducción	
1.1 Fisiología de las células endoteliales.....	6
1.2 El cáncer de mama y la metástasis tumoral.....	8
1.3 Las interacciones celulares en la reacción inflamatoria y en la diseminación tumoral.....	11
1.4 Moléculas de Adhesión en el progreso tumoral.....	14
Justificación.....	19
Hipótesis.....	19
Objetivo General y Objetivos Específicos.....	20
Materiales y Métodos.....	21
Resultados.....	33
Discusión.....	54
Conclusiones.....	67
Bibliografía.....	68
Anexos.....	72
I. Soluciones	
II. Protocolos Experimentales	
III. Bioinformática de VCAM-1	
IV. Artículo Original	

Índice de figuras y tablas

<i>Figura 1.</i> Expresión de proteínas en las células endoteliales activadas.....	7
<i>Figura 2.</i> Conversión de una célula normal a cancerosa.....	9
<i>Figura 3.</i> Eventos fisiológicos del progreso tumoral.....	10
<i>Figura 4.</i> Eventos de la reacción inflamatoria.....	12
<i>Figura 5.</i> Regulación de genes por NF- κ B.....	13
<i>Figura 6.</i> Familias de moléculas de adhesión.....	14
<i>Figura 7.</i> Imágenes de la adhesión entre células tumorales y células endoteliales.....	34
<i>Figura 8.</i> Histograma de adhesión entre células tumorales y células endoteliales.....	35
<i>Figura 9.</i> Electroforesis unidimensional de los factores solubles tumorales.....	36
<i>Figura 10.</i> EMSA de la traslocación de NF- κ B al núcleo de células endoteliales.....	40
<i>Figura 11.</i> Imágenes de fluorescencia de la expresión de VCAM-1 en células endoteliales.....	42
<i>Figura 12.</i> Western blot de la expresión de VCAM-1 en células endoteliales.....	43
<i>Figura 13.</i> Western blot de la expresión de VCAM-1 en células endoteliales pretratadas con tunicamicina.....	46
<i>Figura 14.</i> Patrones Bidimensionales de células endoteliales analizados con el programa Image Master 2D Platinum TM	48
<i>Figura 15.</i> Imágenes elaboradas por el programa Image Master 2D Platinum TM de las manchas en el área de posible ubicación de VCAM-1.....	49
<i>Figura 16.</i> Westerns bidimensionales de células endoteliales con la expresión de isoformas de VCAM-1.....	53
<i>Figura 17.</i> Mapas de exones de VCAM-1 “a” y VCAM-1 “b” a partir del NCBI.....	60
<i>Tabla 1.</i> Moléculas de adhesión en diferentes tipos de cáncer.....	16 y 17
<i>Tabla 2.</i> Análisis del contenido en los factores solubles tumorales.....	38
<i>Tabla 3.</i> Análisis de expresión de las manchas de patrones 2D en el área de posible ubicación de VCAM-1.....	50
<i>Tabla 4.</i> Resumen con las isoformas de VCAM-1.....	64

Resumen

Introducción: Durante la metástasis y la inflamación varios aspectos del comportamiento de las células endoteliales son similares, en particular, el incremento en la expresión de moléculas de adhesión de superficie como VCAM-1. La expresión de VCAM-1 sirve como un marcador biológico específico para la activación de las células endoteliales y también puede ayudar a definir fenotipos endoteliales involucrados en la diseminación tumoral. Estados diferenciales de N-glicosilación en VCAM-1 son de gran importancia para desempeñar su función celular y por lo tanto, también podrían ser relevantes para esta invasión tumoral. En este proyecto, se aplicó proteómica comparativa para el estudio de modificaciones postraduccionales e identificar variantes N-glicosiladas de VCAM-1 en cultivos primarios de células endoteliales humanas estimuladas con TNF o con factores solubles derivados de líneas celulares tumorales de cáncer de mama.

Métodos: Factores solubles secretados por líneas celulares tumorales de cáncer de mama con diferente capacidad metastásica: alta (ZR.75.30) o baja (MCF-7), fueron recuperados y sus efectos se compararon con los que produce el TNF en células primarias endoteliales humanas, como son: inducción de una capacidad adhesiva, expresión de VCAM-1 a través de western blot y traslocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo a través de EMSA. Finalmente, con la combinación de las técnicas de geles bidimensionales (2D-PAGE) y western blot, analizamos la expresión de isoformas de VCAM-1 en la presencia o ausencia de un inhibidor de N-

glicosilación (tunicamicina) en extractos celulares totales. Por otro lado, el ensayo Bio-Plex™ fue utilizado para analizar el contenido de los factores tumorales secretados por los dos tipos de líneas celulares tumorales de cáncer de mama.

Resultados: Los factores solubles tumorales de las células con alta capacidad invasiva o metastásica (ZR 75.30) tuvieron efectos similares a los producidos por el TNF sobre las células endoteliales: indujeron un fenotipo endotelial adhesivo, indujeron la expresión de VCAM-1 así como de isoformas N-glicosiladas de la proteína y también, indujeron la traslocación de NF-κB al núcleo de las células estimuladas. Todas estas respuestas celulares observadas, correlacionaron con el alto contenido de: IL-6, IL-8, MCP-1, G-CSF y VEGF en los factores solubles tumorales que, son elementos inductores aunque de forma más moderada que el TNF, de cambios en el fenotipo endotelial. Fue muy interesante observar, que a pesar de la similitud de respuesta producida por los factores solubles tumorales y TNF, no fue detectado el contenido de esta citocina en el análisis de los factores. Los factores solubles derivados de las líneas con bajo potencial metastásico (MCF-7) no tuvieron actividad biológica sobre las células endoteliales y no contuvieron ninguno de los 27 factores analizados por el sistema Bio-Plex™.

Conclusiones: Los factores solubles tumorales secretados por las líneas celulares de cáncer de glándula mamaria con diferente potencial metastásico, difieren en su contenido de citocinas y quimiocinas inflamatorias así como de factores de crecimiento. En particular, los factores secretados por la línea celular ZR75.30 inducen un fenotipo

endotelial activado similar al inducido por TNF durante la reacción inflamatoria. La diferencia más importante de estos dos estímulos sobre las células endoteliales, fue la intensidad de inducción de variantes N-glicosiladas de la molécula de adhesión VCAM-1, en particular una variante con un peso molecular de ~77 kDa y un punto isoeléctrico de 6.0.

Abstract

Introduction: During metastasis and inflammation several aspects of endothelial behaviour are similar, in particular the increased expression of cell adhesion molecules. Expression of VCAM-1 serves as a specific biological marker for endothelial cell activation and could also help to define endothelial phenotypes involved in the tumoral dissemination. Differential N-glycosylations in VCAM-1 are of great importance for its known cellular function and hence might also be relevant for the tumoral invasion. We applied comparative proteomics to study post-translational modification variants of VCAM-1 in primary human endothelial cells stimulated with TNF or with tumoral soluble factors derived from human breast cancer cells lines.

Methods: Tumoral soluble factors secreted by breast cancer cell lines with high (ZR.75.30) or low (MCF-7) metastatic potential were recovered and compared with the effects produced by TNF on primary human endothelial cells adhesion capacity, expression of VCAM-1 through western blot and activation of NF- κ B through EMSA. With the combination of 2DE and western blot techniques, we analyzed the expression of VCAM-1 isoforms in the presence or absence of an inhibitor of N-glycosylation (tunicamycin). Bio-Plex™ assay was used to analyze in depth the mix of factors contained in the two types of tumoral soluble factors.

Results: Tumoral soluble factors from ZR 75.30 cells had similar effects as those produced by TNF on endothelial cells, including: a pro-adhesive phenotype, expression of VCAM-1, translocation of NF- κ B to the nucleus and expression of N-glycosylated VCAM-1 isoforms. The tumoral soluble factors from the high metastatic potential cells (ZR75.30) contained high levels of IL-6, IL-8, MCP-1, G-CSF and VEGF, while those derived from low metastatic potential cells (MCF-7) had no biological activity and did not contain any of the 27 factors analyzed by the Bio-Plex™ system.

Conclusions: Tumoral soluble factors secreted by breast cancer cell lines with high or low metastatic potential differ in their content of inflammatory cytokines, chemokines and growth factors. Those secreted by ZR75.30 induced an endothelial phenotype analogous to the activated state induced by TNF during the inflammatory response. These factors and TNF differed too, in the intensity of the induction of VCAM-1 N-glycosylation variants, in particular one with 77 kDa/pI 6.0.

1. Introducción

Es mucho mejor lanzarse a hacer cosas grandiosas, que jugar en terreno seguro y nunca conocer que es la victoria o la derrota

Anónimo

Fisiología de las células endoteliales

Las células endoteliales forman la capa celular interna de todos los vasos sanguíneos y linfáticos funcionando como un intermediario entre la sangre circulante y los tejidos subyacentes. Se le considera un importante órgano metabólico, crítico en la generación y regulación de múltiples procesos fisiológicos y patológicos tales como: la coagulación, la hemostasia, la inflamación, la aterosclerosis, la angiogénesis y la diseminación tumoral o metástasis de células cancerosas (Dua et al., 2005; Michiels, 2003).

A partir de los 80's el conocimiento sobre las propiedades funcionales de las células endoteliales se ha incrementado ya que, esta capa celular puede pasar de ser una membrana pasiva a transformarse en una membrana con funciones especializadas adaptadas a las necesidades del entorno (Bhati et al., 2008; Brant-Zawadzki et al., 2007; Dejana, 2004).

En personas adultas, el estado fisiológico de las células endoteliales 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 células están proliferando como ocurre en la angiogénesis, su comportamiento es comparable al de las células subconfluentes *in vitro*, pueden elongarse, ser estimuladas por factores de crecimiento y adquieren una elevada capacidad móvil (Bhati et al., 2008). La estimulación más conocida sobre las células endoteliales es por citocinas tanto *in vivo* como *in vitro*, las principales son: la interleucina-1 (IL-1- β), el factor de necrosis tumoral (TNF) y los interferones (IFN), pero existen también algunos reportes de los efectos biológicos que provocan

otras citocinas como la IL-2, IL-4, IL-6 y el TGF β . Las células endoteliales se consideran estimuladas o activadas si se tornan adhesivas para las células sanguíneas (Leeuwenberg et al., 1992; Lopez-Bojorquez et al., 2004). La expresión de genes y síntesis de proteínas producidas por la activación (**Figura 1**), no representan un proceso de diferenciación ya que, todos los cambios que experimentan las células endoteliales son reversibles (Goepfert et al., 2000). Las células endoteliales no sólo son activadas por citocinas sino que también pueden sintetizarlas y secretarlas cuando cambian al fenotipo activado. TNF, IL-1 β e IL-6 son parte del repertorio de citocinas inflamatorias, producidas por el endotelio que actúan tanto de modo autócrino como parácrino, permitiendo la amplificación y difusión de la respuesta. Factores de coagulación, receptores para factores de crecimiento, radicales libres, moléculas de adhesión celular y cambios en el arreglo del citoesqueleto, son parte también del fenotipo activado del endotelio que lo capacita para la trans migración leucocitaria que sigue a la adhesión (Kim et al., 2001; Leeuwenberg et al., 1992; Moldovan et al., 2000).

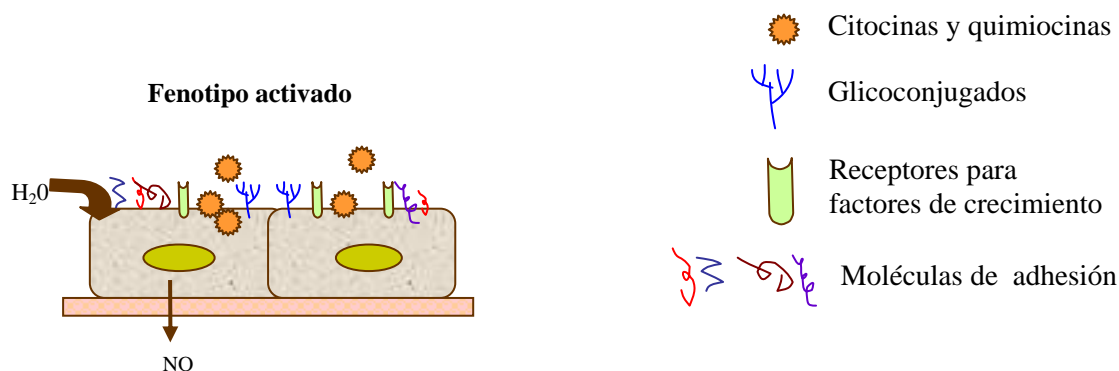


Figura 1. Representación esquematizada del tipo de proteínas expresadas por las células endoteliales que han sido activadas por citocinas. La expresión de estas proteínas favorece la adhesión celular y la trans migración hacia los tejidos subyacentes de las células inmunes que viajan en el torrente sanguíneo.

El cáncer de mama y la metástasis

El cáncer es la condición patológica en la cual las células de un organismo proliferan descontroladamente, resulta de un largo periodo de latencia en el que ocurren y se acumulan, mutaciones que regulan la diferenciación y la proliferación celular (Ajani and Allgood, 2005; Baker and Kramer, 2008; Barrera Saldana et al., 2003). Los factores que pueden causar daño al ADN y transformar una célula normal a tumoral son muy diversos y pueden pertenecer a cualquiera de las tres siguientes categorías: agentes biológicos (virus, parásitos y bacterias); químicos (arsénico o asbesto entre otros) y físicos (exposición a radiación ionizante). Los cambios celulares originados pueden ser: genéticos (inserción, deleción, traslocación de genes), hereditarios (el daño ocurre en las células germinales) o epigenéticos (el cambio no ocurrió propiamente en el ADN sino a nivel de la expresión de los genes) (Adem et al., 2003; Bergamaschi et al., 2008; Bernstein et al., 2007; Claes et al., 2003; Costa et al., 2004).

Durante la progresión del cáncer se van generando clonas celulares que pueden tener más o menos ventajas selectivas, por lo que dentro de un tumor existe una selección que es proporcional con mayor pérdida de las características del tejido de origen. **Figura 2.**

El cáncer de mama o glándula mamaria es actualmente la neoplasia de mayor frecuencia y a nivel mundial, representa la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres (Bergamaschi et al., 2008; Costelloe et al., 2009; Chanrion et al., 2008; Cheang et al., 2008; Imyanitov and Hanson, 2003). Es una enfermedad compleja que involucra una gran variedad de factores de en su etiología y desarrollo. 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.

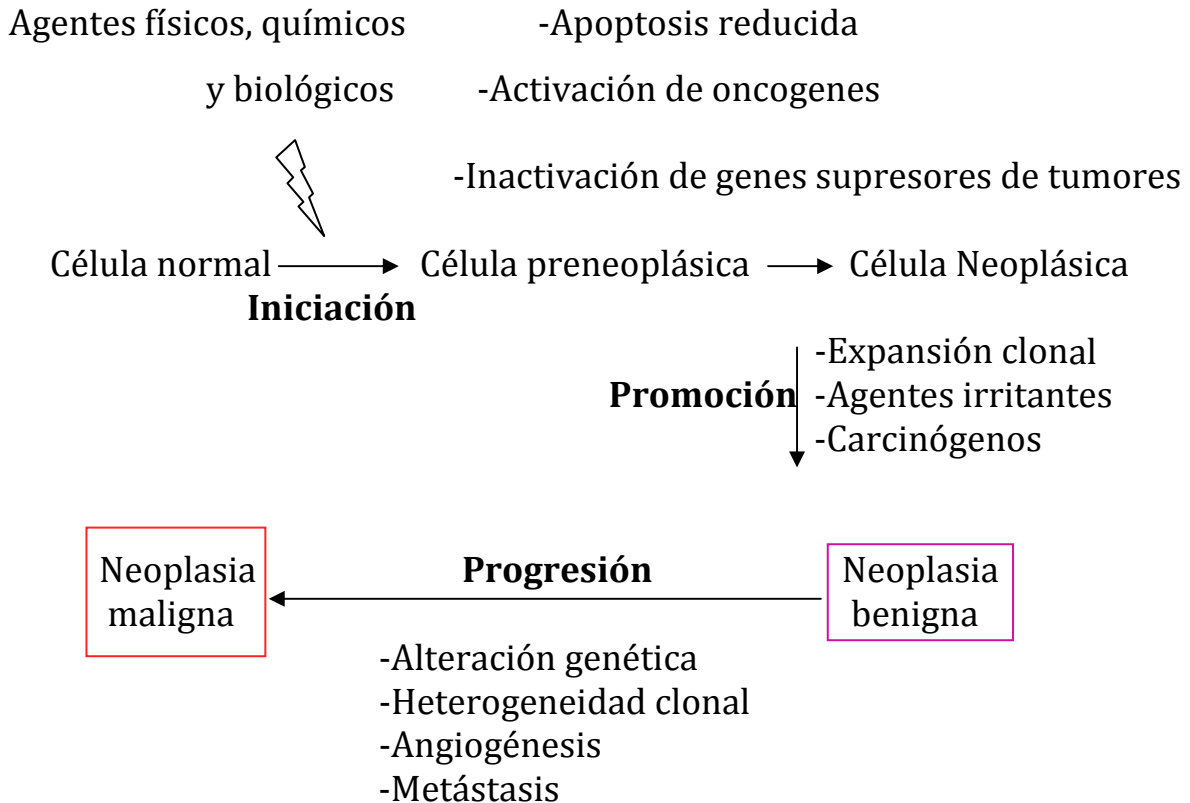


Figura 2. El proceso de conversión de una célula normal en cancerosa está favorecido por su interacción con agentes físicos, químicos o biológicos, hasta alcanzar un fenotipo maligno.

Las mutaciones en los genes: BRCA1 y BRCA2, p53, PTEN, ATM, NBS1 o LKB1, son responsables de una alta proporción de los cánceres de mama hereditarios (Benzra et al., 2003; Ciernikova et al., 2003; Mincey, 2003; Ottini et al., 2003).

La capacidad de invasión de las células tumorales, les permite penetrar en el interior de los vasos sanguíneos y linfáticos para posteriormente implantarse en un sitio separado o distante del tumor de origen. Esta

característica de algunos tumores se conoce como metástasis y es de hecho, la principal causa de mortalidad por cáncer. 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 puede entonces completar la invasión tumoral. 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 sanguínea (intravasación), sobrevivir en circulación, arrestarse en un nuevo sitio distante del tumor de origen, extravasarse para invadir el tejido circundante e iniciar de nuevo un proceso de crecimiento y vascularización o angiogénesis (Budhu and Wang, 2006; Chambers et al., 2002; Harmey et al., 2002; Kawaguchi, 2005; Moss et al., 2000). **Figura 3.**

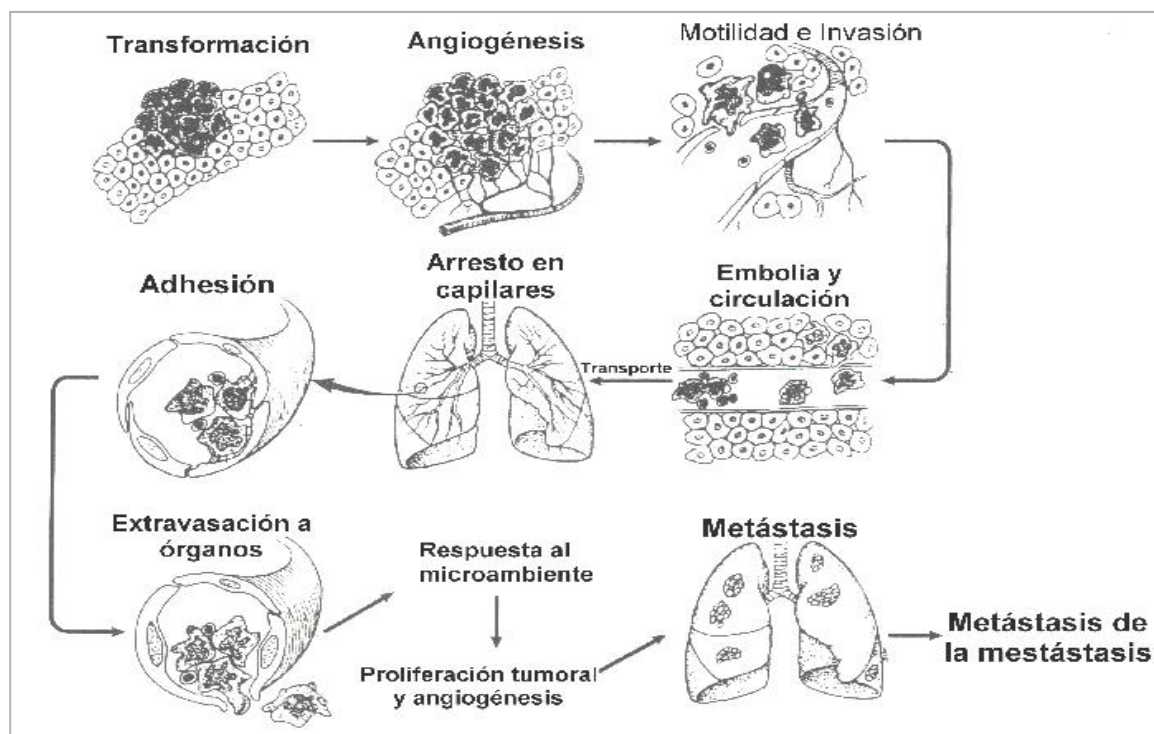


Figura 3. Esquema de eventos fisiológicos que llevan el progreso tumoral hasta la

metástasis, la cual es favorecida por el microambiente del órgano que se va a colonizar.
(Imagen de Fidler, 1990).

La instalación de las células tumorales en los vasos sanguíneos del órgano blanco a invadir, se relaciona con cambios fenotípicos en el endotelio vascular que permiten la extravasación de la circulación sanguínea por parte de los leucocitos en la reacción inflamatoria y, según la hipótesis actual, de las células tumorales con capacidades metastásicas. El fenómeno de extravasación responde a una interacción célula tumoral-célula endotelial que permitirá o no el paso de las células si existen las condiciones apropiadas para la invasión (Smid et al., 2008; Wu et al., 2008; Yoneda, 2000).

Las interacciones celulares en la reacción inflamatoria y la diseminación tumoral

En las etapas tempranas de la inflamación, los neutrófilos son las células que migran al sitio de inflamación por influencia de: factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, que son producidas por macrófagos y mastocitos residentes en el tejido (Lu et al., 2006). El proceso de extravasación celular del torrente sanguíneo puede dividirse en cuatro etapas secuenciales: 1) rodamiento, 2) activación por el estímulo quimioatrayente, 3) paro y adherencia y 4) migración transendotelial (Lopez-Bojorquez, 2004; Simiantonaki et al., 2002; Yan et al., 2006).

Figura 4.

Si la respuesta inflamatoria no es regulada, la respuesta celular se tornará crónica y será dominada por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos

con morfología variada. Durante el proceso inflamatorio los macrófagos y las células endoteliales generan una gran cantidad de factores de crecimiento, citocinas y especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) que pueden causar daño al DNA. Si los macrófagos y el endotelio permanecen activados, pueden permitir que el daño tisular continúe predisponiendo la inflamación crónica a una neoplasia (Lopez-Bojorquez et al., 2004; Lu et al., 2006; Yan et al., 2006).

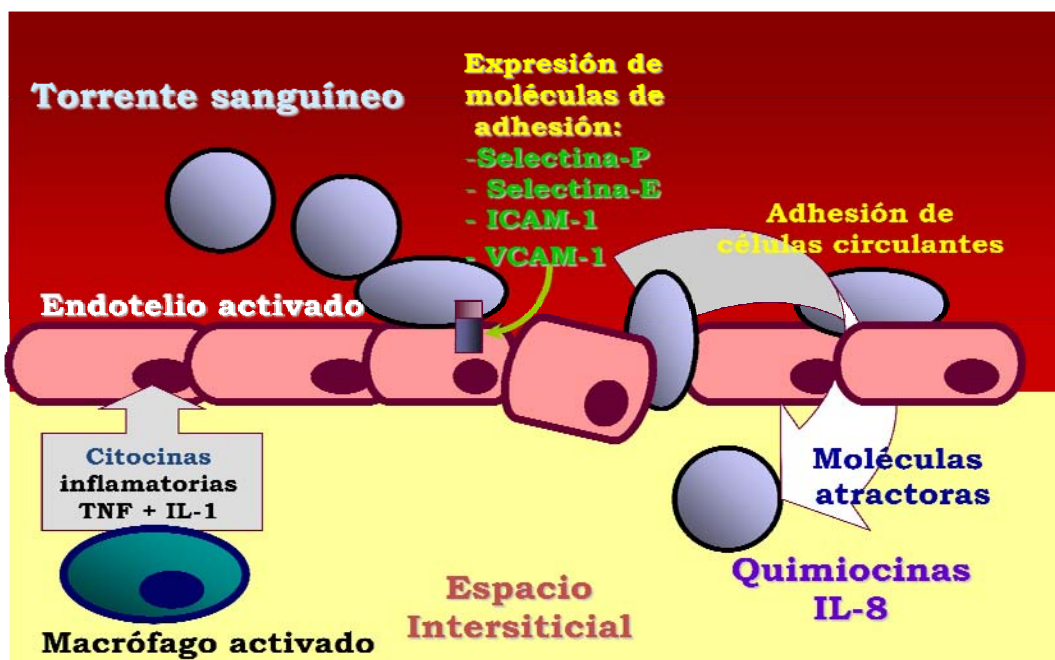


Figura 4. Eventos de la reacción inflamatoria: activación endotelial por citocinas, expresión de moléculas de adhesión de superficie, reconocimiento y adhesión de leucocitos que viajan en el torrente sanguíneo, extravasación guiada por quimioatrayentes hacia el sitio de la lesión.

El ambiente inflamatorio que rodea a un tumor favorece el rompimiento de la membrana basal, un proceso requerido para la invasión y migración de células metastásicas. Las células tumorales también son capaces de producir citocinas y quimiocinas que facilitan su evasión del sistema inmune y les ayudan al establecimiento y desarrollo de la metástasis. El

incremento de macrófagos asociados a un tumor se asocia a un mal pronóstico a través de diversos mecanismos: a) liberación por parte de los macrófagos de IL-10 y prostaglandina E₂ las cuales suprimen la respuesta antitumoral; b) facilidad para liberar factores angiogénicos como VEGF, EGF, endotelina-2 y activador de plasminógeno que promueven el crecimiento tumoral; c) facilitar la invasión de las células metastásicas al liberar metaloproteinasas de matriz e inducir la producción de TNF y la enzima de vasodilatación óxido nítrico sintetasa (Kawaguchi, 2005; Thorne et al., 2004).

El TNF es expresado en bajas cantidades por otras células como fibroblastos, células de músculo liso y células tumorales. Su blanco celular principal son las células endoteliales, induciendo su activación al cambiar los niveles de expresión de algunas proteínas de membrana, principalmente moléculas de adhesión como selectina E, ICAM-1 y VCAM-1 cuya expresión y síntesis, son reguladas por el factor de transcripción nuclear κ B. El fenotipo activado endotelial inducido por el TNF y las características propias de la respuesta inflamatoria, han servido para comparar el fenotipo endotelial que se ha observado, se produce en respuesta al contacto con factores solubles tumorales (FST) (Li et al., 2003; Watts et al., 2002).

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es un factor de transcripción primordial en la regulación de los genes de respuesta inflamatoria temprana involucrados en la interacción célula-célula, comunicación intercelular, reclutamiento o trans migración, amplificación de señales patogénicas y en la aceleración de la tumorigénesis (Estrada-Bernal et al., 2003; Ma et al., 2009; Mendoza-Milla et al., 2005). **Figura 5.**

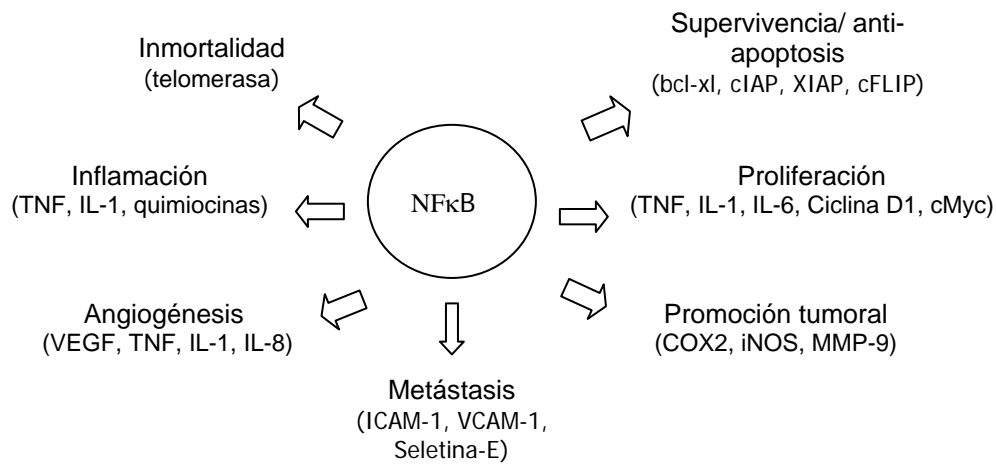


Figura 5. NF-κB es el regulador en la expresión de numerosos genes involucrados tanto en procesos fisiológicos como patológicos

Actualmente se han identificado cinco miembros de la familia NF-κB en mamíferos: NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (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 DNA, dimerización e interacción con el inhibidor intracelular de NF-κB (IκB) (Lu et al., 2006).

Moléculas de adhesión en el progreso tumoral

Tanto en las interacciones celulares fisiológicas inflamatorias, como en las interacciones patológicas de la metástasis, intervienen diversas moléculas de adhesión celular (CAMs), que se encuentran clasificadas en cuatro grandes grupos: *superfamilia de las inmunoglobulinas, cadherinas, selectinas e integrinas* (Okegawa, 2004, Weiss, 2000). **Figura 6.**

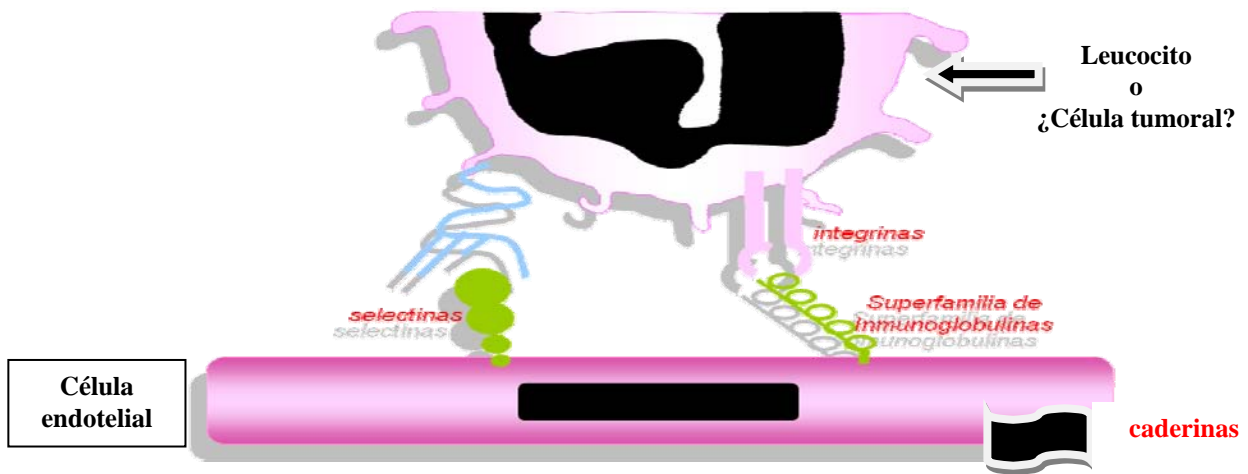


Figura 6. Las familias de moléculas de adhesión participan principalmente, en las interacciones célula-célula entre células endoteliales y leucocitos durante la reacción inflamatoria (selectinas, integrinas o superfamilia de inmunoglobulinas) o bien, en las interacciones célula-sustrato basal (caderinas).

Hasta el momento, son más de 50 las CAMs que se han identificado como promotoras de la cascada metastásica (Alexiou et al., 2003; Benoliel et al., 2003; Kawaguchi, 2005; Lieder et al., 2005; Okegawa et al., 2002). Trabajos recientes describen como estas moléculas desempeñan un papel importante en procesos patológicos como la metástasis. **Tabla 1.**

Los miembros que pertenecen a la superfamilia de 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 y, hasta 5 unidades repetidas semejantes a fibronectina en sus dominios extracelular, transmembranal e intracelular. El dominio con las unidades semejantes a Ig se compone de 70-100 residuos de aminoácidos que se organizan en dos cadenas β antiparalelas, estabilizadas por enlaces disulfuro. Existen cerca de cien miembros en esta superfamilia entre ellos: ICAM-1, 2, 3; LFA-2, 3; NCAM, PECAM-1 y

VCAM-1 (Banks et al., 1993; Chang et al., 2005; Charpin et al., 1998; Kirshner et al., 2003).

Superfamilia de Inmunoglobulinas (VCAM-1)

Los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas son un gran grupo de glicoproteínas de superficie celular especializado en la adhesión celular. En general, las glicoproteínas son componentes importantes de las membranas biológicas que participan en diversas funciones biológicas, incluyendo: la protección inmunológica, el transporte de iones, la adhesión celular y el reconocimiento molecular. Estructuralmente, las glicoproteínas están compuestas de un centro péptidico con cadenas de hidratos de carbono covalentemente unidos a asparagina (N-glicosilación), o unidos a serina/treonina (O-glicosilación) (Kannagi et al., 2004; Kariya et al., 2008).

La molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) es una glicoproteína de 80-110 kDa que se identificó por primera vez como una molécula inducida por citocinas en células endoteliales durante la inflamación. El contrareceptor de VCAM-1 es la molécula de adhesión VLA-4 (very late antigen 4), que pertenece a la familia de las integrinas, el reconocimiento y acoplamiento de estas dos moléculas es vital para el reclutamiento de leucocitos. VCAM-1 es principalmente expresada por las células endoteliales activadas, pero también se encuentra en células dendríticas, en células del túbulo proximal renal. Existe la forma soluble de VCAM-1 la cual, se encuentra presente en el suero de individuos sanos y recientemente, una concentración aumentada de VCAM-1 de este tipo, ha sido reportada en el suero de pacientes con diversos tipos de cáncer (Kim

et al., 2001; Richard et al., 1999; Simiantonaki et al., 2002).

Niveles aumentados de esta molécula de adhesión, se pueden encontrar también en enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, la esclerosis sistémica, el lupus eritematoso y la artritis reumatoide (Alexiou et al., 2003; Byrne et al., 2000; O'Hanlon et al., 2002; Tesarova et al., 2003).

Es claro que las células endoteliales y las moléculas de adhesión de su superficie, representan la última barrera que las células metastásicas deben de superar para generar invasiones secundarias; todo esto, favorecido por los cambios que se producen en el fenotipo endotelial mediante la secreción de factores solubles al medio que lo estimulan o activan y que aún no están identificados en la mayoría de los casos.

Tabla 1. Moléculas de Adhesión de la superfamilia de inmunoglobulinas y sus contrareceptores de la familia de las integrinas que han sido involucrados con algún tipo de cáncer.

	Molécula de Adhesión	Otro nombre	Tipo de cáncer en el que se le ha involucrado	Referencia
<i>Superfamilia de Inmunoglobulinas</i>	VCAM-1	CD106	Mama Melanoma Gástrico Próstata Vasculatura tumoral Colon Carcinoma renal	Byrne et.,al. 2000 Madhavan et., al 2002 Shih IM, 1999 Galamb et.,al. 2008 Velikova et.,al. 1997 De Cicco et.,al. 2008 Gosk et.,al. 2008 Gallichio et.,al. 2008 Wu TC, 2007
	ICAM-1	CD54	Síndromes mielodisplásicos Carcinoma hepatocelular y de páncreas Líneas de cáncer oral Cabeza y cuello Linfoma no-Hodgkin's Gástrico	Buccisano et.,al. 2008 Helaly GF and Shamaa LA, 2006 Sawada et.,al. 2006 Sundelin et.,al. 2007 Georgolios et.,al. 2006 Darom et.,al. 2006 Nakata et.,al. 2000
	MUC 18	CD146	Melanoma Próstata Mama	Shih IM, 1999 Wu et.,al. 2005 Wang et.,al. 2005
	NCAM	CD56	Gliomas	Todaro et.,al. 2007
	IGSF11	ESAM	Colon Gástrico Hígado	Watanabe et.,al. 2005
	JAM-C	JAM 3	Adenocarcinoma de pulmón	Santoso et.,al. 2005
	CEA	Antígeno o carcinoembrionario	Colon	Kuespert et.,al. 2006

<i>Integrinas</i>	$\beta 1$	CD29	Carcinoma de células pequeñas de pulmón Melanoma Gástrico Células progenitoras de cáncer Mama Renal Colorectal y gástrico Pancreático	Seftor et.,al. 1999 Klemke et.,al. 2007 Snider et., al. 2008 Wei et.,al. 2007 Imanishi et.,al. 2007 Brener et., al. 2004 Gulubova M, 2002 Brakebusch et.,al. 2002
	$\beta 2$	CD18	Leucemia Colorectal y gástrico	Wu et.,al. 2007 Gulubova M, 2002

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que las interacciones funcionales y físicas entre células tumorales y endoteliales se han propuesto como eventos muy importantes durante el fenómeno de la metástasis o invasión tumoral, actualmente son muy pocos los estudios enfocados en las moléculas que median la adhesión entre ambos tipos celulares. Los estudios que muestran que en algunos tipos de cáncer de colon la selectina-E es esencial para la metástasis y que el bloqueo de su expresión con cimetidina reduce la invasión de estos tumores, fortalecen la idea de que la interferencia en la expresión de moléculas de adhesión entre células tumorales y el endotelio puede contribuir a la reducción de diseminación tumoral.

La lista de moléculas de adhesión ha ido en constante aumento a lo largo de los últimos 10 años y para la mayoría de ellas no se cuenta con anticuerpos que tengan la capacidad de neutralizar su función. Estas limitaciones dificultan una aproximación bioquímica clásica tratando de descartar a las moléculas candidato de una en una. Por esta razón, este proyecto aplicó un análisis proteómico de geles bidimensionales, centrándose en identificar los cambios de expresión de antígenos de superficie de la membrana de células endoteliales antes y después de ser activadas con TNF o con los factores solubles derivados de células tumorales de cáncer de mama.

HIPÓTESIS

Ya que los factores solubles derivados de células tumorales pueden promover la activación de células endoteliales en forma análoga a lo que ocurre en la reacción inflamatoria, proponemos que en los patrones de expresión de proteínas de estas células, deben encontrarse moléculas relevantes para la adhesión de células tumorales como sería el caso de VCAM-1.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y analizar cambios en la expresión de marcadores de superficie (buscando identificar moléculas de adhesión) en células endoteliales humanas primarias tratadas con los factores solubles derivados de células tumorales de cáncer de mama.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el patrón de expresión de proteínas en geles de dos dimensiones estableciendo diferencias en su peso molecular y punto isoeléctrico de células endoteliales no tratadas y, tratadas con TNF o con los factores solubles secretados por las células tumorales de cáncer de mama
- Comparar los patrones de expresión de proteínas de las células endoteliales
- Identificar y comparar diferencias en la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 en las células endoteliales no tratadas y tratadas
- Evaluar la importancia de las proteínas identificadas en un fenómeno de adhesión *in vitro*

2. Materiales y Métodos

2.1 Cultivo de las células endoteliales humanas obtenidas de la vena de cordones umbilicales (HUVECs)

Las células fueron extraídas a partir de la vena de cordones umbilicales provenientes de partos normales y cesáreas de embarazos sanos. Los cordones se obtuvieron en el Hospital de Gineco-Obstetricia No.4 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) “Dr. Luis Castelazo Ayala”, después de que el protocolo de investigación fuera aprobado por el comité de ética interno.

Una vez colectados, los cordones fueron transportados y mantenidos en una solución amortiguadora de fosfatos fría (PBS frío) hasta el momento de ser procesados. El proceso de extracción de las células, se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar, bajo condiciones de esterilidad y asepsia. El procedimiento fue modificado del establecido en 1973 (Jaffe et al., 1973) y a grandes rasgos fue el siguiente:

- Los cordones recolectados en PBS frío se limpiaron con gasas estériles
- La vena umbilical fue canulada con la finalidad de lavarla, eliminar coágulos y residuos sanguíneos utilizando PBS
- Digestión enzimática en la vena umbilical durante 15 min a 37°C y una atmósfera de 100% de humedad relativa, con tripsina al 0.1% (Sigma, USA) disuelta en una solución de verseno
- La suspensión de células endoteliales se colectó en tubos estériles con 5 ml de suero de ternera para inactivar la tripsina y se centrifugó a 1000 x g durante 10 min
- El botón celular obtenido de 1-4 cordones se resuspendió en medio M-199 (Gibco /BRL, USA) suplementado con 1% de glutamina (Gibco /BRL, USA), 20 µg/ml de factor de crecimiento endotelial (Biomedical Technologies Inc, USA), 100 µg/ml de heparina (Sigma, USA), 10% de suero fetal bovino (SFB) y una mezcla al 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco /BRL, USA)
- La suspensión de células endoteliales obtenidas de aproximadamente 4 cordones umbilicales se sembraron en cajas de Petri de 75 cm² y se mantuvieron en incubación a

37°C con atmósfera de CO₂ al 5% y humedad saturada de H₂O

- A las 24 h de haber sido sembradas, las células fueron lavadas cuidadosamente 2 o 3 veces (según la cantidad de detritus y hematíes que tuviera el cultivo) con PBS suplementado con 3 mM de CaCl₂ y 5 mM de MgCl₂ (PBS Ca²⁺Mg²⁺)

Después de aproximadamente una semana de cultivo, las células fueron despegadas con 4 ml de una solución de tripsina 0.1% (Sigma, St Louis MO, USA) preparada en una solución de verseno durante 5 min a 37°C. Una vez que los cultivos alcanzan confluencia, las células fueron centrifugadas a 1000 x g durante 4-6 min y resuspendidas nuevamente en M-199 suplementado, para ser sembradas a una densidad de 3 x 10⁴ células/cm² en placas de 48 pozos y realizar los ensayos de adhesión o bien, en cajas de Petri de 75 cm² para la extracción de proteína total usada en los diferentes tipos de electroforesis.

2.2 Cultivo de las líneas celulares tumorales y Obtención de los factores solubles tumorales (FST)

Las líneas celulares tumorales de cáncer de mama: MCF-7, MDA MB-435, T47D, ZR75.30 y MDA MB-231, fueron sembradas en botellas de cultivo de 75 cm² con medio RPMI sin rojo fenol suplementado con 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco/BRL, USA), 5% de SFB (Gibco) y 5% de suero de ternera (Gibco), mantenidas en incubadora a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% y humedad saturante. Una vez que llegaron a confluencia, la monocapa de células se lavó con 10 ml de PBS-Ca²⁺Mg²⁺ por 6 veces para remover y diluir los componentes del suero sin provocar desprendimiento de las células. Posteriormente, los cultivos fueron incubados con 25 ml de medio RPMI sin SFB y sin rojo de fenol y después de 48 h de incubación, el medio que ahora contenía a los factores solubles secretados por las células tumorales, se colectó y se centrifugó durante 45 min a 2000 rpm. El sobrenadante fue recuperado en tubos estériles y congelado para después ser liofilizado. El polvo resultante conteniendo los factores solubles tumorales, fue concentrado al resuspenderlo con H₂O en solo una décima parte del volumen original y posteriormente, esta resuspensión fue centrifugada a 5000 rpm por 60 min a 4°C. Este concentrado fue dializado 2 veces, cada una de 24 h, en una membrana de ultrafiltración de 10 kDa con una solución de PBS. Finalmente, las soluciones con FST obtenidas fueron nuevamente centrifugadas a 5000 rpm por 60 min a 4°C, se esterilizaron

pasándolas por un filtro de 0.22 μm y fueron almacenadas a 4°C hasta su utilización en los experimentos con las HUVECs. Se utilizaron 50 μl de cada uno de estos FST para determinar su contenido de proteína con el reactivo comercial de Bradford (BIO-RAD, Hércules, CA, USA), utilizando concentraciones de 0 a 16 $\mu\text{g/ml}$ de albúmina bovina sérica (Sigma, St. Louis MO, USA) para la curva patrón.

2.3 Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE) de los factores solubles tumorales

Para separar y observar los patrones de proteínas presentes en los factores solubles tumorales obtenidos de las líneas celulares de cáncer de mama, se realizó una electroforesis en un gel concentrador de acrilamida al 4% y un gel separador al 10%. 5 μg de proteína de cada solución con los factores solubles tumorales fueron separadas, las muestras fueron mezcladas en una proporción 1:1 con amortiguador 5x de Laemmli, colocadas a ebullición en baño maría durante 10 min y, estabilizadas por 5 min a 4°C para después colocarlas en el gel. Las muestras se corrieron a 80 v durante 15 min y después el voltaje fue aumentado a 100 v hasta obtener la separación deseada de las proteínas guiándonos con las bandas del marcador de peso molecular. Para la visualización de las proteínas separadas, el gel fue teñido con nitrato de plata (Silver staining kit protein, GE Healthcare, Bio-Science Sweden).

2.4 Condiciones de cultivo de las líneas celulares humanas de cáncer de mama

Todas las líneas celulares humanas de cáncer de mama así como las células del mieloma humano U937, se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) y se mantuvieron en cultivo de acuerdo a las indicaciones, con medio RPMI con rojo de fenol (Gibco/BRL, USA) suplementado con 10% de SFB y una mezcla de antibióticos y antimicótico: penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 $\mu\text{g/ml}$, anfotericina 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Las células fueron mantenidas en una incubadora con humedad relativa del 100%, una temperatura de 37°C y una atmósfera con 5 % de CO_2 .

2.5 Marcaje de las células U937 para el ensayo de adhesión con timidina tritiada

Las células U937 fueron cultivadas por 48 h en un medio suplementado con timidina tritiada, un isótopo radiactivo capaz de incorporarse al DNA. Al medir la radiación emitida por las células, es posible cuantificar indirectamente el porcentaje de estas células que se han adherido a la monocapa endotelial al final del ensayo. Las células se mantuvieron por 48 h en medio RPMI suplementado con 10% de SFB al que se le añadió 1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de timidina tritiada (New England Nuclear, USA). Posteriormente, las células marcadas fueron recuperadas, lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en medio M-199 suplementado para ponerlas en contacto con las células endoteliales.

2.6 Ensayo de Adhesión

Las células endoteliales se dejaron crecer a confluencia en placas de 48 pozos (1 cm^2/pozo). Cuando los pozos llegaron a confluencia, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de TNF o de FST para su activación. El tratamiento de las células se llevó a cabo por 3 h a 37°C en una atmósfera controlada con 100% de humedad relativa y 5% de CO_2 . Al término de la incubación se retiraron los medios que contenían el TNF o los FST de las monocapas endoteliales y las células endoteliales se colocaron en contacto con las células de mieloma humano U937 por 3 h más, para permitir la interacción con el endotelio. Las células U937 marcadas con timidina tritiada (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$), se colocaron a una densidad de $2\text{-}2.5 \times 10^5$ células U937/ cm^2 , que fue una cantidad suficiente para cubrir por completo la monocapa de células endoteliales. Al término de este tiempo, los pozos se lavaron 3 veces con PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$. Posteriormente cada pozo con la monocapa de células endoteliales y las U937 adheridas, fue lisado e hidrolizado con 500 μl de NaOH 0.2 N. Después de 48 h esta solución alcalina se mezcló con 3 μl de líquido de centelleo y la radiactividad incorporada se cuantificó en un contador de emisiones Beta (1600 TR PACKARD, USA), (Estrada-Bernal et al., 2003).

Los ensayos de adhesión se realizaron con cuatro cultivos independientes y cada condición por triplicado. Los valores radioactivos fueron reportados como porcentajes de adhesión tomando como 100% la radiactividad contenida en la proporción de células U937 para adhesión/pozo.

2.7 Obtención de extractos nucleares para EMSA

Las células endoteliales se sembraron a una densidad de 2.5×10^4 células/cm² con medio M-199 suplementado. Después de la aplicación de los diferentes tratamientos, las células se lavaron 2 veces con PBS, todo el proceso se llevó a cabo sobre hielo a 4°C. Las células se rasparon de las placas utilizando 1 ml de PBS y un gendarme, se recuperaron en un tubo Eppendorff y se centrifugaron a 3000 x g durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y el botón se congeló durante 1.5 min en un baño de hielo seco-etanol. El botón se resuspendió con 100 µl de amortiguador hipotónico "A" (pH=7.9) y se incubó a 4°C durante 10 min. Esta solución es usada para romper la membrana citoplasmática, permitiendo obtener las proteínas citosólicas. El lisado celular fue centrifugado a 3500 X g durante 10 min, el sobrenadante (fracción citosólica) se retiró cuidadosamente y se guardó en pequeñas alícuotas de 20 µl a -70°C hasta el momento de su uso, el botón de núcleos se resuspendió en 50 µl de amortiguador hipertónico "C". El buen estado de los núcleos se evaluó con la tinción de azul tripano (Sigma, St. Louis MO, USA) en una proporción 1:1. Los núcleos se incubaron durante 30 min en agitación continua a 4°C. Se centrifugaron durante 20 min a 4°C a 14 000 X g y el sobrenadante obtenido que contiene la proteína nuclear fue colectado y guardado en alícuotas de 20 µl a -70°C, hasta el momento de su uso. La concentración de proteína fue cuantificada en los extractos nuclear y citosólico con el reactivo comercial de Bradford, empleando una curva patrón de albúmina sérica bovina.

2.8 Tratamiento con tunicamicina

Las células endoteliales fueron sembradas en placas de Petri de 75 cm² en el primer pasaje desde su obtención. La tunicamicina liofilizada (Sigma, St. Louis MO, USA), fue resuspendida en metanol siguiendo las especificaciones del fabricante y quedando a una concentración final de 2.5 mg/ml. El día del experimento, el medio M-199 que mantenía a las HUVECs, fue reemplazado por medio fresco con 1 mg/ml de tunicamicina (Matthies et al., 1999), las células fueron mantenidas en incubadora con este inhibidor por 3 h. Terminado este tiempo, el medio fue reemplazado por nuevo y conteniendo los tratamientos de la siguiente manera: tunicamicina (1 mg/ml) y TNF

(10 ng/ml) o bien, tunicamicina (1 mg/ml) y FSTZR75.30 (1 mg/ml) por 6 h más. Finalmente, las monocapas celulares fueron lavadas 2 veces con PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ después de corroborar al microscopio su integridad y lisadas dependiendo su uso con: 1) amortiguador RIPA, para utilizar los extractos totales proteicos en geles unidimensionales o 2) amortiguador desnaturante de urea, para utilizar los extractos de proteína en geles bidimensionales.

2.9 Inmunoensayos tipo "Western blot"

En geles desnaturantes de poliacrilamida al 10% tipo SDS-PAGE, se separaron 50 μg de extractos de proteína total previamente desnaturizada a 94°C durante 5 min en amortiguador de carga Laemmli 5x. La separación de las proteínas, se realizó en una cámara de electroforesis mini Protean III (BIO-RAD, Hércules, CA, USA) en dos etapas: primero a 80 volts durante 15 min y después a 100-120 volts por 2 h más aproximadamente. Mediante una electrotransferencia húmeda, las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilion, tamaño de poro 0.45 μm , Millipore, Buckinghamshire, UK) durante toda la noche a 40 wats.

La inmunodetección consistió en: **i)** bloqueo de la membrana de PVDF que tiene embebidas a las proteínas totales endoteliales, con una solución de TBS con 0.1% de Tween-20 y 5% de leche descremada por 1 h; **ii)** incubación con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en agitación, en una solución de TBS-tween con 0.1% de albúmina; **iii)** 5 lavados con TBS-tween, 3 de 10 min cada uno y 2 de 5 min; **iv)** incubación del anticuerpo secundario por 1 h, en una solución de TBS-tween con 5% de leche descremada; **v)** serie de 5 lavados con un enjuague final de TBS sin tween y, revelado de las proteínas de interés mediante quimioluminiscencia donde, la enzima peroxidasa de rábano (HRP) catalizó la emisión de luz a 428 nm a través de la oxidación del luminol con un reactivo comercial supersignal (PIERCE, Rockford, GB), que fue revelada al exponer una película fotográfica (Kodak, Rochester NY, USA) a diferentes tiempos.

Los anticuerpos primarios fueron: anti-VCAM-1 monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluído 1:250 y anti-actina 1:1000 (donado por el Dr. Manuel Hernández, del CINVESTAV-IPN).

2.10 Electroforesis Bidimensional

Los extractos totales de proteínas se separaron de acuerdo al principio de la técnica en 2 propiedades fisicoquímicas: su carga eléctrica y su peso molecular.

Preparación de las muestras

Considerando la concentración total de proteína determinada con el método de Bradford (densidad óptica a 595 nm), la limpieza de las muestras se realizó en 200 µg de extracto siguiendo las especificaciones del kit 2D Clean-Up (Amersham, Piscataway USA), el cual consiste en la precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético (TCA) en frío. Las sales, detergentes, lípidos y ácidos nucleicos son eliminados mediante centrifugaciones; después de lavar con acetona a -20°C, se obtuvieron proteínas libres de sustancias que interfirieran con la separación electroforética por carga eléctrica o isoelectroenfoque. Las proteínas purificadas se resuspendieron en un volumen de 125 µl en una solución de De-Streak (Amersham BioSciences, Piscataway USA), amortiguador compatible con la primera dimensión al que se le adiciona el 2% de anfolitos de pH 3-10.

Primera Dimensión

Para la separación de las proteínas de acuerdo a su carga eléctrica o isoelectroenfoque, las muestras se embebieron en tiras de 7 cm con un rango de pH inmovilizado de 3-10 por 15 h aproximadamente. El isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo en un sistema Ettan IPGphor II (GE Healthcare, Bio-Science, Sweden) con el protocolo especificado por los fabricantes para este tipo de tiras que consta de 4 pasos.

Segunda Dimensión

La separación de las proteínas de acuerdo a su tamaño se llevó a cabo en condiciones reductoras, es decir, una vez terminada la primera dimensión las tiras siguieron a un proceso de equilibrio durante 30 minutos en dos etapas: 15 min en un amortiguador desnaturalizante de equilibrio con 70 mM de DTT y 15 min en el mismo amortiguador pero con 140 mM de Iodoacetamida.

Para la separación por peso molecular o segunda dimensión de las proteínas, se utilizaron geles desnaturalizantes de acrilamida al 10% SDS-PAGE de 1.5 mm de grosor y una

cámara de electroforesis Protean III (BIO-RAD Hércules, CA, USA). El tiempo de corrida fue de 2 h a 100v aproximadamente. Al finalizar la separación en segunda dimensión de las proteínas, los geles obtenidos fueron fijados y teñidos con tinción de nitrato de plata o con fluorescencia (Silver staining kit protein/Deep purple, GE Healthcare, Bio-Science Sweden).

2.11 Tinción con nitrato de plata

La tinción de plata depende de la unión de plata iónica a las proteínas y su posterior reducción a su forma metálica. Todos los procedimientos se realizaron con agitación y a temperatura ambiente. El volumen aproximado por gel fue de 25 ml. Todas las soluciones se prepararon con agua Milli Q™ (Millipore, UK) al momento de su uso y no fueron recuperables. Para preservar los geles, fueron colocados en una solución de conservación con 10% etanol y 4% de glicerol Las imágenes fueron obtenidas con un equipo Image Scanner III (GE Healthcare, Bio-Science Sweden).

2.12 Tinción con deep purple

Los geles se fijaron toda la noche en una solución con etanol al 10% y ácido acético al 7.5% en un volumen de 25 a 50 ml por gel. Al día siguiente los geles se lavaron con agua durante 30 min, se tiñeron durante 1 h en la oscuridad con una solución que contiene una parte del colorante fluorescente Deep purple y 199 partes de una solución de 200 mM de carbonato de sodio Na_2CO_3 . Los geles finalmente, se lavaron 3 veces con 25 ml de una solución con ácido acético al 7% durante 15 min cada vez. La obtención de la imagen digital se realizó al escanear los geles con un sistema Typhoon 9400 y las siguientes características: filtro láser verde 532 nm, sensibilidad PMT de 550-600 V y una resolución de 50 micrones.

2.13 Análisis de los patrones bidimensionales proteicos

Para el análisis de proteínas a partir de geles bidimensionales, utilizamos el programa Image Master 2D Platinum versión 6.0 (GE Healthcare, Bio-Science Sweden).

2.14 Inmunoensayo tipo "Western Blot" de geles bidimensionales

Los geles bidimensionales fueron obtenidos bajo los parámetros ya descritos en esta sección y una vez terminada la separación de las proteínas por peso molecular, se procedió a transferir estos geles a una membrana de PVDF y a realizar la detección de VCAM-1 bajo las mismas condiciones que los westerns unidimensionales.

2.15 Ensayo de retardo de 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 nativo de acrilamida, el ADN unido a la proteína se separa del no unido, el cual corre más rápidamente, y de ahí 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 estimuladas con los diferentes tratamientos. 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.

Fosforilación de Oligonucleótidos

A partir de 20 ng/ μ l de oligonucleótido kappa B (secuencia consenso NF- κ B 5'-AGTTGAGGGGACTTCCAGG-3'; Santa Cruz, CA) se hizo la reacción de fosforilación del extremo 3' con ATP radiactivo (32 P) marcado en la posición gamma. A 1 μ l del oligonucleótido se le agregó 0.5 μ l de la enzima T4 poli nucleótido cinasa equivalente a 5 unidades (Fermentas, PNK), 1 μ l de amortiguador de cinasa T4 (Fermentas, PNK), 0.5 μ l de (32 P) γ -ATP con una actividad específica de 6000 Ci/mmol más 7 μ l de agua. Todo se mezcló con cuidado, se incubó a 37 $^{\circ}$ C durante 30 min, posteriormente se inactivó a 65 $^{\circ}$ C durante 15 min. La mezcla se enfrió lentamente y se le agregaron 30 μ l de amortiguador TBE (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 0.5 mM, pH 8.0). A 10 μ g de extractos nucleares de células HUVECs se les agregaron 5 μ l de una mezcla que contenía: DTT 1 mM, 2% glicerol, 10 μ g de ASB, 1 μ g de poly-dI-dC (Amersham Biosciences, Germany), 1 μ l de la sonda marcada (32 P) γ -ATP y se incubaron durante 20 min a temperatura

ambiente. Los complejos formados (volumen final de 20 μ l) se separaron por electroforesis a 100 v durante 2 h en un gel nativo de poliacrilamida al 5% en amortiguador TBE (Tris-HCl 89 mM, Borato 89 mM y EDTA 0.5 M, pH 8.0) que se recorrió a 80v durante 1 h. Al terminar la electroforesis, el gel fue colocado entre rectángulos grandes de papel filtro, envuelto en papel celofán dulce y colocado en una secador de geles (Gel Dryer Model 583, BIO-RAD) a 90°C conectado a una bomba de vacío (HydroTech™ Vacuum Pump, BIO-RAD). El gel se dejó secar durante 2 h y posteriormente, se colocó en un cassette para radiactividad durante toda la noche. Las imágenes se visualizaron por autoradiografía en un sistema analizador de imágenes Phosphorimager con un programa de Image Quant (Molecular Dynamics, San Francisco CA, USA) o en el Typhoon 9400 (Amersham Bioscience).

2.16 Análisis del contenido de elementos en los factores solubles tumorales

El equipo Bio-Plex (BIO-RAD Hércules, CA, USA), utiliza un método modificado de ELISA empleando microesferas que tienen adheridos anticuerpos para las citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento que se analizarán. La concentración de los elementos, se estimó mediante el uso de anticuerpos secundarios acoplados a un fluorocromo. El equipo es capaz de medir la concentración de muchos elementos al mismo tiempo, para este proyecto fueron específicamente 27 elementos los que se analizaron, a partir de muestras de 50 μ l de la solución de FSTZR75.30. Cada uno de los 27 elementos analizados entre citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas que contiene este kit, presentan un límite inferior y un límite superior de concentración que son detectados por el equipo, de acuerdo a estos valores se calculó la cantidad presente de cada elemento en los FSTZR75.30.

3. Resultados

El genio es un uno por ciento de inspiración y un noventa y nueve por ciento de sudor.

Thomas Alva Edison, físico e inventor estadounidense

3.1 Los factores solubles tumorales (FST) secretados por las líneas celulares de cáncer de mama, indujeron un fenotipo endotelial activado que se caracterizó por un incremento en la capacidad de adherir células del mieloma humano U937.

El ensayo estandarizado por nuestro grupo (Estrada-Bernal et al., 2003), se basa en la adhesión de células U937 con células endoteliales (HUVECs) previamente estimuladas con los FST. El tratamiento de las HUVECs se llevó a cabo por 3 h y posteriormente, se coincubaron con las células U937 por 3 h más; al final de este tiempo, la adhesión fue cuantificada después de que las células U937 no adheridas al endotelio fueron removidas con 2 lavados suaves de solución de fosfatos.

Las imágenes que se muestran en la **figura 7** son representativas de la adhesión entre las células U937 y HUVECs una vez finalizado el ensayo antes de ser cuantificado. En los paneles de la parte B de la figura, se muestra a las células HUVECs teniendo diferentes grados de adhesión dependiendo el tratamiento incluyendo dos diferentes factores solubles tumorales (FST).

La **figura 8**, muestra la cuantificación representativa de la capacidad adhesiva de las HUVECs, al ser tratadas con los FST derivados de diferentes líneas celulares de cáncer de mama. Las líneas ZR75.30 y MDA-MB231, han sido reportadas como células con un alto potencial de invasividad (Benezra et al., 2003; Yu et al., 2007) y los FST derivados de ellas, coincidieron en ser los que indujeron un fenotipo más activo de HUVECs, reflejado proporcionalmente con una mayor capacidad de adhesión de células U937. La proporción de adhesión inducida por estos factores (1µg/ml) (1.5 veces), solo estuvo por debajo de la que indujo el tratamiento con la citocina TNF (10 ng/ml) (2.6 veces).

La adhesión inducida por los FST de las líneas MDA-MB435 y T47D, fue ligeramente mayor a la que se observó en las células control no tratadas. En contraste, los FST de la línea MCF-7, no promovieron diferencias estadísticas con respecto al control.

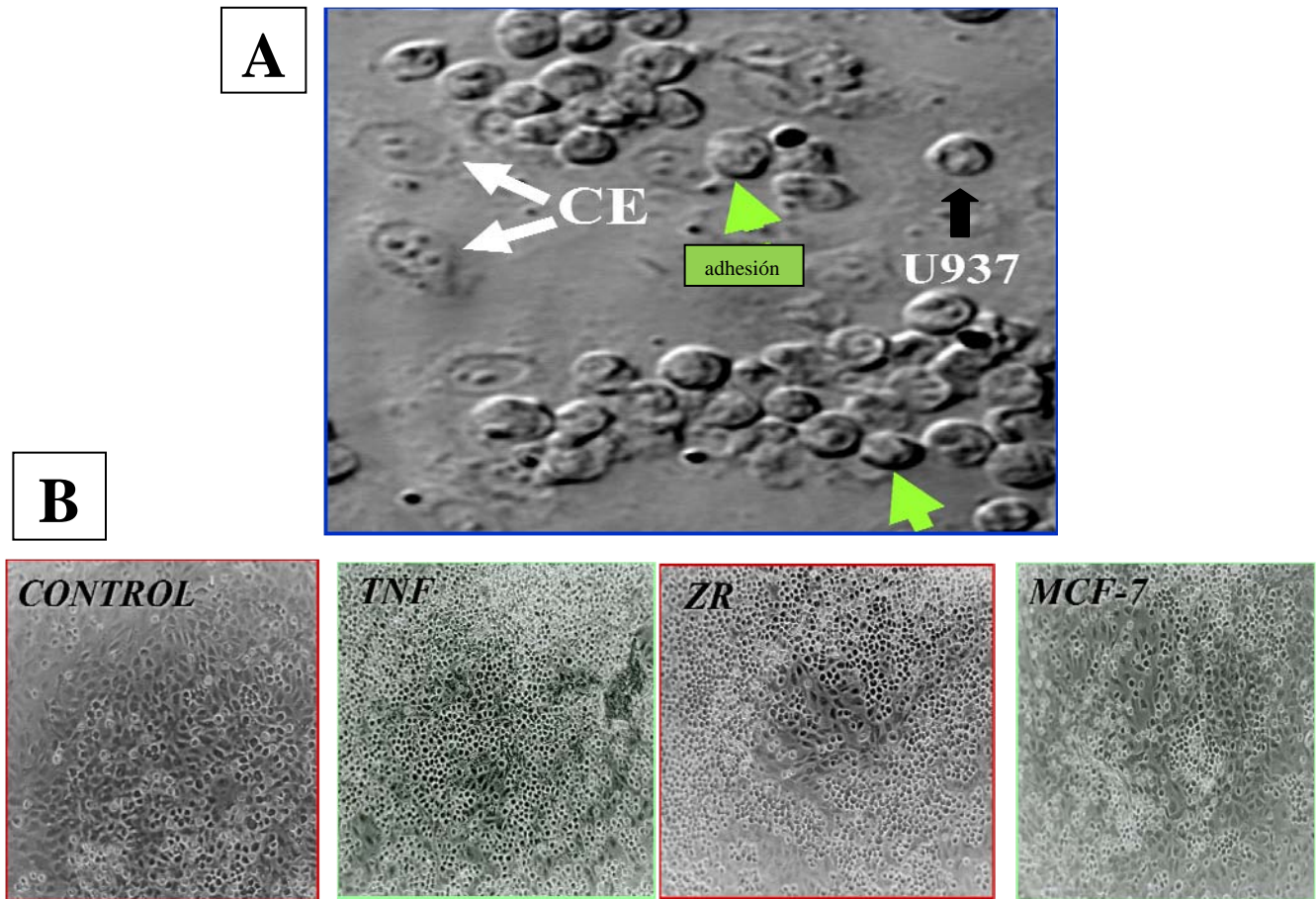


Figura 7. Las células endoteliales tratadas con factores solubles tumorales son capaces de adherir células U937. A) Imagen ampliada de microscopía de contraste de fases en la cual, se pueden observar en el plano inferior a las células endoteliales (CE) y, en el plano superior a las células U937 con las que han establecido una interacción (magnificación 100x); B) Proporción diferencial de células U937 adheridas a las células endoteliales dependiendo el tratamiento (magnificación 10x). TNF: factor de necrosis tumoral 10 ng/ml; ZR: FST derivados de la línea de cáncer de mama ZR75.30; MCF-7: FST derivados de la línea de cáncer de mama MCF-7.

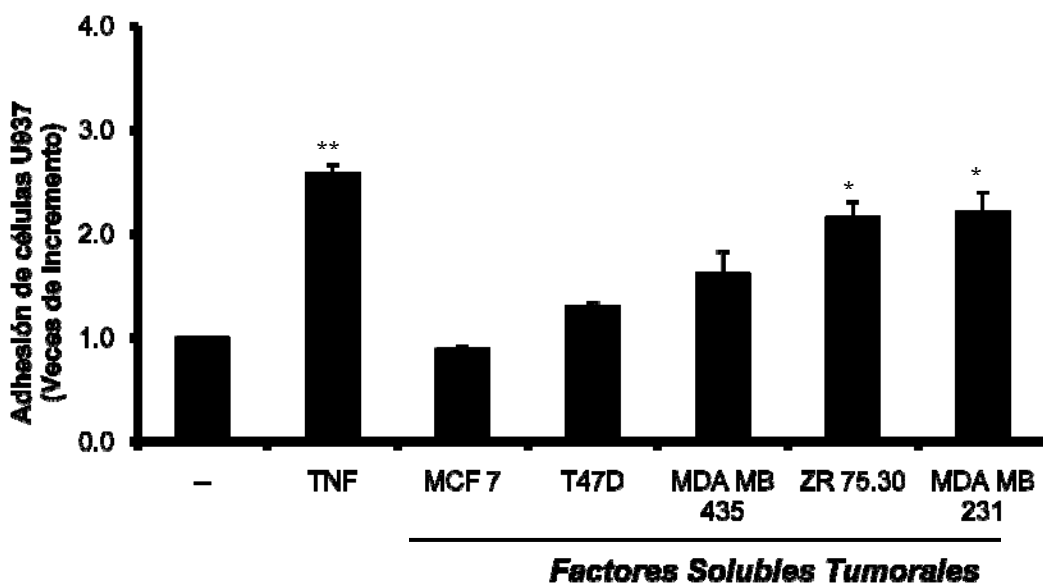


Figura 8. Cuantificación de la adhesión de células U937 sobre las HUVECs tratadas con los FST de diferentes líneas de cáncer de mama. Las células endoteliales tratadas con TNF se tomaron como control positivo. $p < 0.01 = **$ y $p < 0.05 = *$

3.2 Los factores solubles tumorales derivados de las líneas de cáncer de mama: ZR75.30 (metastásica) y MCF-7 (no metastásica) y su contenido.

Basándonos en los resultados del ensayo de adhesión, optamos por escoger dos de los cinco FST producidos, para analizar su efecto sobre las HUVECs. Uno de los que indujeron el estado de activación endotelial (FSTZR75.30); y uno que no tuvo efecto (FSTMCF-7), empleado como control negativo.

Quisimos visualizar si las diferencias en su habilidad para incrementar la capacidad adhesiva de HUVECs, correlacionaba con una presencia diferencial de proteínas secretadas. Por tanto, separamos 5 μ g de proteína total de los FSTZR75.30 y FSTMCF-7 por electroforesis unidimensional en geles desnaturizantes SDS-PAGE al 10% de acrilamida-bisacrilamida. **Figura 9.**

Con el fin de incrementar la sensibilidad y poder visualizar el mayor número de bandas, el gel fue teñido con nitrato de plata. El patrón de bandas obtenido, no presentó grandes diferencias en el rango de 75 a 37 kDa. Los patrones de bandeo que presentan diferencias evidentes se encuentran en las zonas de: 250 kDa y en el rango de 37 a 20 kDa.

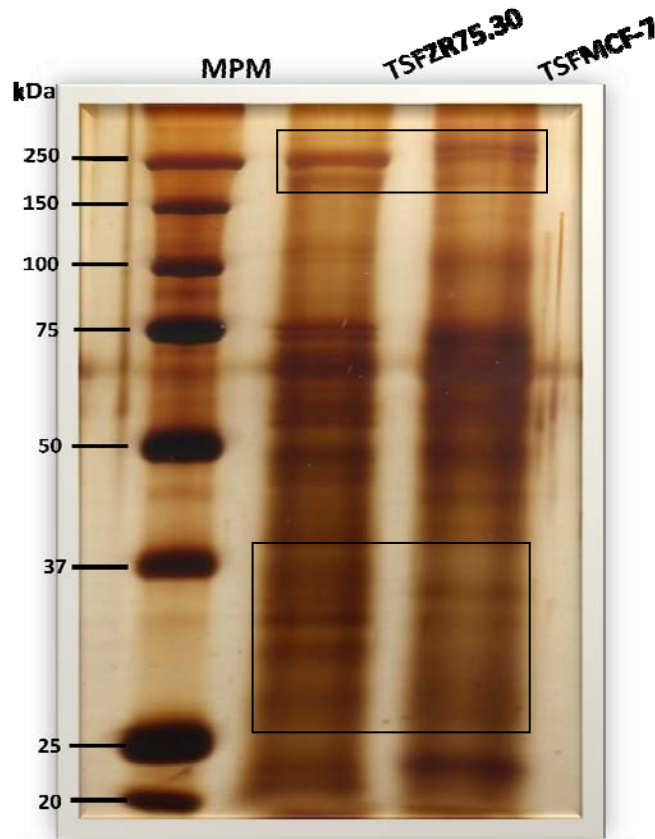


Figura 9. Patrones de proteínas contenidas en los FSTZR y FSTMCF-7, obtenidas por SDS-PAGE y teñidas con nitrato de plata (5 μ g de proteína total). Los marcadores de peso molecular (MPM) se observan a la izquierda de la imagen. Las áreas de patrón electroforético con mayores diferencias en bandas, han sido enmarcadas.

Una alternativa para analizar mezclas complejas de proteínas solubles, como las contenidas en los factores tumorales, es el sistema de ELISAs múltiples o Bio-Plex™. En este caso, los elementos analizados con este sistema fueron una serie de 27 proteínas entre factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, todas ellas asociadas a diferentes fases del proceso inflamatorio.

Habiendo medido las concentraciones de los elementos proteicos por este sistema, generamos 3 categorías principales para el análisis de los resultados: i) elementos con niveles de concentración por debajo del límite de detección, ii) elementos dentro del rango de detección y finalmente, iii) elementos por encima del límite de detección del sistema.

Los FST presentaron grandes diferencias entre ellos en cuanto a la cantidad de las proteínas medidas. Los FSTMCF-7 mostraron contenido de 2 elementos en niveles detectables: VEGF y GM-CSF; el resto de los elementos estaban por debajo del nivel mínimo detectable en el sistema. En cambio, los FSTZR75.30 presentaron grandes concentraciones de cinco elementos: IL-6, IL-8, G-CSF, MCP-1 y VEGF que incluso, estuvieron por encima del rango máximo detectable por el sistema; trece elementos estuvieron dentro del rango detectable (GM-CSF, IFN γ , TNF, IL-1 β , IL-12, IL-13, IL-17, MIP-1 β , IL-1 α , IL-15, Eotaxina, FGF-básico y PDGF-BB) y finalmente, nueve elementos de los 27 estuvieron por debajo del rango mínimo detectable (IL-2, IL-4, IL-10, IL-5, IL-7, IL-9, IP-10, MIP-1-a, RANTES). **Tabla 2.**

Los cinco elementos detectados en grandes concentraciones en los FSTZR75.30 son reconocidos por ser capaces de inducir el fenotipo activado de las células endoteliales ante una gran diversidad de respuestas celulares fisiológicas y patológicas (Chavey et al., 2008; Wehbe et al., 2006; Yan et al., 2006).

TABLA 2. Análisis del contenido de los factores solubles tumorales derivados de las líneas de cáncer de mama ZR75.30 y MCF-7 examinados por el sistema Bio-Plex.

Elemento analizado	RANGO DE DETECCIÓN			
	TSFZR75.30 (pg/μl)	TSFMCF-7 (pg/μl)	Máximo (pg/μl)	Mínimo (pg/μl)
IL-2	1.3	< 1.3	21517	1.3
IL-4	0.2	< 0.2	3854	0.2
IL-6	<u>≥ 33053</u>	< 2.0	33053	2.0
IL-8	<u>≥ 24800</u>	< 1.5	24800	1.5
IL-10	1.9	< 1.9	30108	1.9
GM-CSF	70.8	<u>21.9</u>	10791	0.6
IFN γ	22.5	< 2.5	40543	2.5
TNF	4.5	< 4.3	70463	4.3
IL-1 β	9.9	< 2.3	37082	2.3
IL-5	2.4	< 2.4	39452	2.4
IL-7	2.7	< 2.7	44339	2.7
IL-12	2.5	< 2.5	41843	2.5
IL-13	5.9	< 2.0	33114	2.0
IL-17	2.6	< 1.6	26740	1.6
G-CSF	<u>≥ 28728</u>	< 1.7	28728	1.7
MCP-1	<u>≥ 27978</u>	< 1.7	27978	1.7
MIP-1 β	3.1	< 2.2	37041	2.2
IL-1 α	26.1	< 2.6	42658	2.6
IL-9	1.6	< 2.0	27064	1.6
IL-15	2.6	< 1.6	26368	1.6
Eotaxina	1.7	< 1.5	24294	1.5
FGF básico	1.8	< 1.1	18355	1.1
IP-10	4.3	< 4.3	69784	4.3
MIP-1 α	1.1	< 1.1	18493	1.1
PDGF-BB	2.9	< 1.9	32062	1.9
RANTES	1.5	< 1.5	24678	1.5
VEGF	<u>2318</u>	<u>122.6</u>	39592	2.4

3.3 El tratamiento de las células endoteliales con los FSTZR75.30, provoca la activación y traslocación al núcleo del factor NF- κ B.

El aumento en la capacidad adhesiva de las células endoteliales, se considera un marcador del fenotipo endotelial activado cuando las células son estimuladas por citocinas como TNF e IL-1 β , este fenotipo está caracterizado principalmente por la expresión de proteínas que pertenecen a las familias de moléculas de adhesión y cuyos promotores responden al factor de transcripción NF- κ B. Por tanto, decidimos evaluar y comparar la activación de este factor y su traslocación al núcleo, en HUVECs tratadas con los FSTZR75.30 y FSTMCF-7, comparando estas respuestas con la que es inducida por TNF.

Los geles de retardo electroforético (EMSAs, electrophoretic mobility supershift assays), mostraron 3 complejos formados por DNA/NF- κ B, pero el que tuvo diferencias más evidentes fue el complejo III (**Figura 10**). En el caso de TNF la traslocación del factor de transcripción fue 3 veces mayor con respecto a las células control, el estímulo de los FSTZR75.30 mostró una activación de NF- κ B por encima del valor del control y a la mitad del inducido por TNF (carril 4). Por último, el tratamiento con los FSTMCF-7, no fue capaz de inducir la activación del factor de transcripción dando lugar incluso, a una ligera disminución en comparación con el valor de las células control (carril 3). Estos resultados muestran que los FSTZR75.30, también son capaces de activar factores de transcripción como NF- κ B al igual que lo hace el TNF (aunque en menor intensidad), a pesar de que el fenotipo endotelial adhesivo inducido por ambos tratamientos es muy similar (figura 2), evidenciando muy posiblemente la ayuda y activación de otros factores de transcripción para alcanzar la magnitud de la respuesta celular observada.

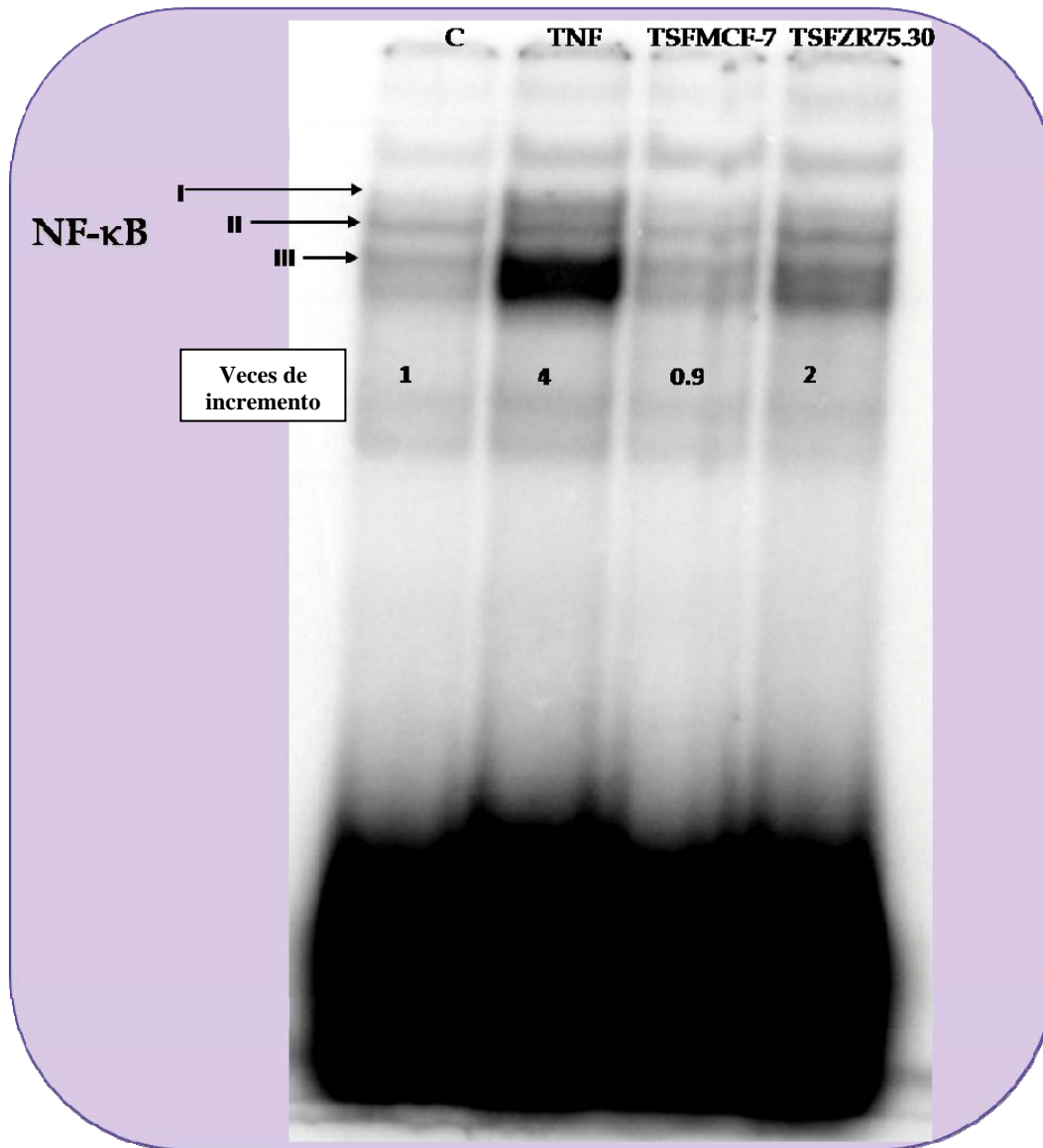


Figura 10. Gel de retardo electroforético para la observación de complejos DNA/NF-κB. Extractos nucleares proteicos obtenidos de las células endoteliales tratadas. Los extractos derivados de las células endoteliales tratadas con TNF fueron las que presentaron bandas de mayor intensidad, seguidas por las células tratadas con los FSTZR75.30.

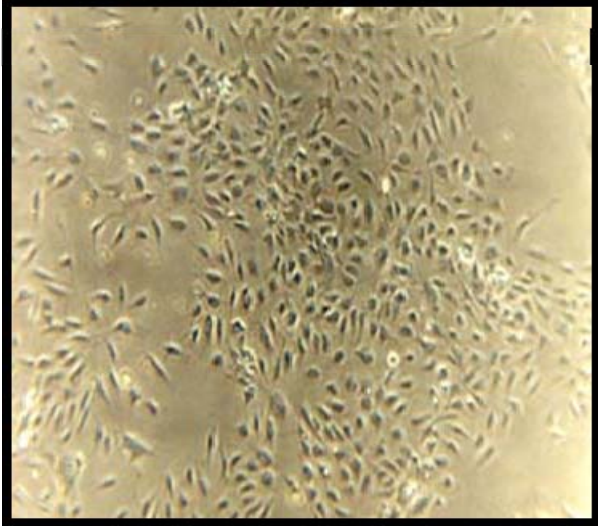
3.4 El tratamiento de HUVECs con los FSTZR75.30 induce la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1

La expresión de moléculas de adhesión, es otra de las principales características de un endotelio que ha sido activado por citocinas proinflamatorias, además del fenotipo adhesivo y de la activación y traslocación de NF- κ B al núcleo. Para saber si los FSTZR75.30 inducían también esta expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales tratadas, estimulamos HUVECs con los factores tumorales y los analizamos con microscopía confocal.

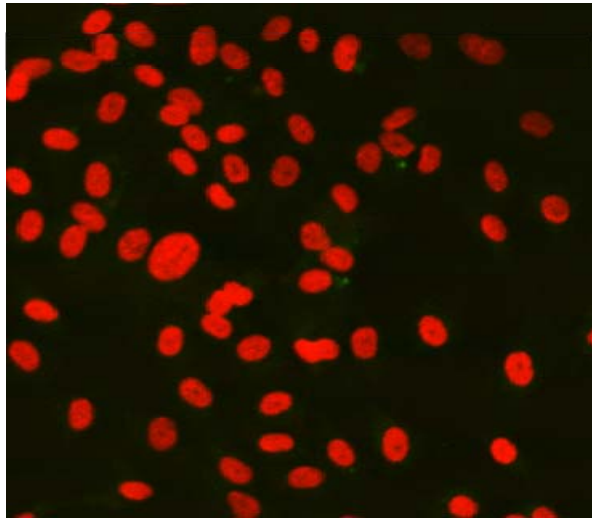
En las imágenes de las células endoteliales tratadas por 6 h con los FSTZR75.30, se detectó la expresión de VCAM-1 como una fuerte señal de fluorescencia en verde (FITC), que estuvo distribuida en prácticamente toda la superficie celular (**Figura 11**). Las células mostraron una apariencia física normal al momento de realizar el tratamiento, así como las incubaciones para el reconocimiento de la molécula de adhesión con el anticuerpo (panel A). El buen estado y funcionamiento del anticuerpo secundario, empleado para reconocer el anticuerpo monoclonal primario de VCAM-1 en las células tratadas, fue corroborado al colocarlo sobre las células estimuladas sin haber incubado previamente las muestras con el anticuerpo primario (panel B). Finalmente, detectamos una intensa señal de VCAM-1 después del tratamiento de las células con los FSTZR75.30 (panel C).

Las micrografías mostraron una clara señal positiva de la expresión de VCAM-1. Con el fin de cuantificar el contenido celular de esta molécula de adhesión se realizaron ensayos tipo western-blot, a partir de extractos totales de HUVEC's tratadas con TNF o FSTZR75.30 que se compararon con células control no tratadas (**Figura 12**).

A



B



C

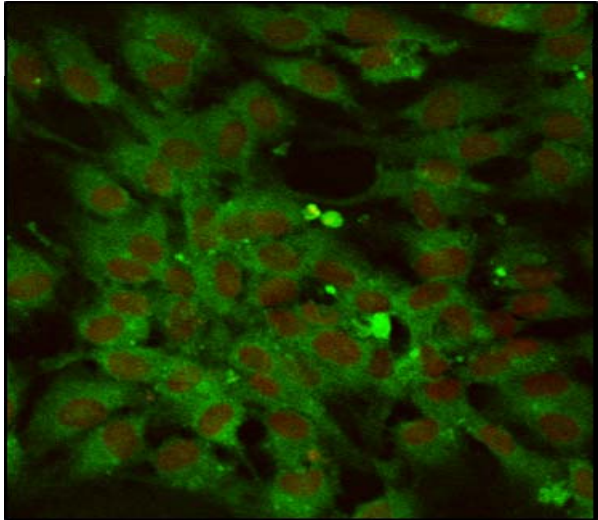


Figura 11. Micrografías de células endoteliales con la expresión de VCAM-1 A) Imagen de HUVECs por microscopía óptica de contraste de fases 40x
B) Imagen de células endoteliales incubadas sólo con anticuerpo secundario 100x
C) Expresión de VCAM-1 observada en verde (FITC) 100x
Núcleos teñidos con iouduro de propidio en rojo.
Amplificaciones confocales

La expresión de VCAM-1 fue apenas perceptible en las células control sin tratamiento (carril 1), al igual que las células tratadas con los FSTMCF-7 (1 µg/ml), usado como un control negativo (carril 4). En cambio, cuando las células fueron tratadas con TNF (10 ng/ml) o FSTZR75.30 (1 µg/ml) la expresión de VCAM-1 incrementó varias veces (carril 2 y 3, respectivamente); esta expresión de hecho fue ligeramente mayor con este último tratamiento pero no fue estadísticamente significativa en comparación con la expresión inducida por el TNF. El análisis densitométrico indicó que la expresión de VCAM-1 con el tratamiento de TNF o FSTZR75.30 fue de 8 y 9 veces respectivamente, por encima de los valores basales. La señal de actina se utilizó para normalizar la carga de proteína y para establecer las veces de incremento por lo cual, en todos los western-blot realizados los anticuerpos contra VCAM-1 y actina se añadieron simultáneamente.

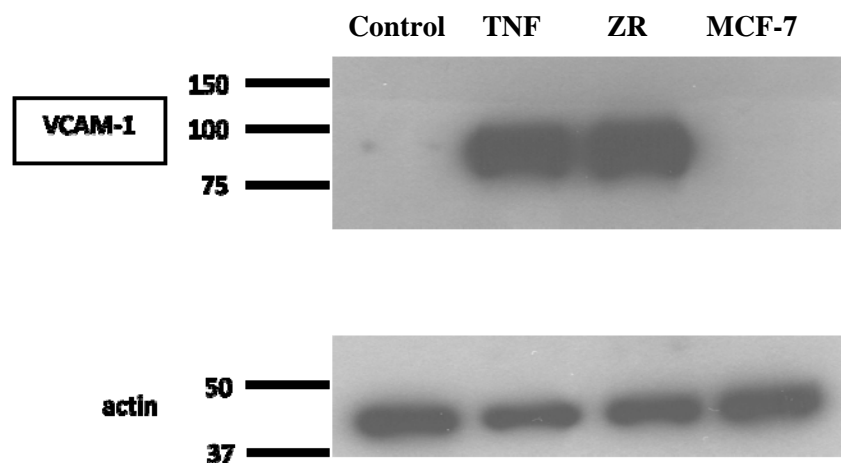


Figura 12. Western-blot para detectar la expresión de VCAM-1 en células endoteliales, a partir de proteína total control o después de 6 h de tratamiento con: TNF, FSTZR75.30 o FSTMCF-7. Los geles utilizados para separar la muestra fueron SDS-PAGE al 10% de acrilamida-bisacrilamida.

3.5 El pretratamiento con tunicamicina de las HUVECs revela isoformas glicosiladas de VCAM-1 con diferentes puntos isoeléctricos y pesos moleculares.

VCAM-1 es una molécula de superficie cuya función principal es el reconocimiento de células del sistema inmune, a través de interacciones con moléculas de adhesión de la familia de las integrinas α L β 1, el ligando más estudiado es la integrina VLA-4. La expresión de dos isoformas de VCAM-1, denominadas isoformas “a” y “b” han sido reportadas en células endoteliales humanas generadas por empalme alternativo, difiriendo en peso molecular y estado glicosilado por la ausencia del exón 5 (*). La señal de estas dos isoformas de VCAM-1 no fue resuelta de forma nítida (**Figura 6**). Para una mejor observación de las dos formas proteicas de VCAM-1 a través de western-blot, los extractos totales de HUVECs fueron separados en geles SDS-PAGE donde la concentración de acrilamida se disminuyó del 10 al 8%.

En las células tratadas con TNF o con los FSTZR75.30, VCAM-1 fue detectada como un doblete de bandas (Figura 13, carriles 3 y 5, respectivamente). La banda de mayor peso molecular y más abundante la nombramos como A, y asumimos que corresponde a la isoforma completa de la molécula reportada por las bases de datos (“a”). La expresión de A se incrementó en ambos tratamientos y este aumento fue de aproximadamente 40 y 60 veces respectivamente, en comparación a la tenue señal de expresión de la proteína en las células control (carril 1). La isoforma corta de VCAM-1 (“b”), asumimos que corresponde a la banda de menor peso molecular que observamos en los westerns la cual nombramos como B, también fue observable con los dos tratamientos.

Con el fin de observar el efecto de TNF o de los FSTZR75.30 sobre la expresión de las dos isoformas de VCAM-1 en sus estados de glicosilación, utilizamos un inhibidor de la formación de N-glicosilaciones como la tunicamicina (1 µg/ml). Evaluamos la expresión de VCAM-1 cuando las HUVECs fueron pretratadas por 3 h con el inhibidor, seguidas por los tratamientos habituales de las células por 6 h con TNF o con los FSTZR75.30 (**Figura 13**). La banda más pesada (A) fue la única que se observó con los dos tratamientos (carriles 4 y 6). La expresión de la isoforma B ya no fue observada cuando las células endoteliales fueron pretratadas con tunicamicina y en ninguno de los dos tratamientos (TNF y FSTZR75.30). Sin embargo, una tercera banda fue reconocida por el anticuerpo contra la molécula de adhesión, esta banda sólo fue observada en el caso de las células pretratadas con tunicamicina y activadas con los FSTZR75.30. El anticuerpo monoclonal dirigido contra VCAM-1 detectó esta isoforma de mayor movilidad electroforética como una proteína de aproximadamente 77 kDa (carril 6). La expresión de esta tercera isoforma de VCAM-1 a la que denominamos X, fue equivalente a sólo una tercera parte de la señal observada con la isoforma A (18 veces).

El pretratamiento de las HUVECs con tunicamicina tuvo un efecto diferencial sobre el estado de glicosilación de VCAM-1 y, permitió revelar una nueva isoforma proteica la cual es más intensa en las células estimuladas con los factores tumorales y que podría corresponder a la proteína no glicosilada.

3.6 Patrones bidimensionales de HUVECs control y tratadas con TNF o con los FSTZR75.30

Empleamos el método de electroforesis bidimensional para separar a las proteínas

de extractos totales de células endoteliales, con la finalidad de analizar a mayor detalle el comportamiento de las isoformas observadas de VCAM-1 en los western-blot unidimensionales. Los patrones nos dieron una visión general de las proteínas expresadas por las células con los distintos tratamientos pero no fueron útiles para identificar a VCAM-1.

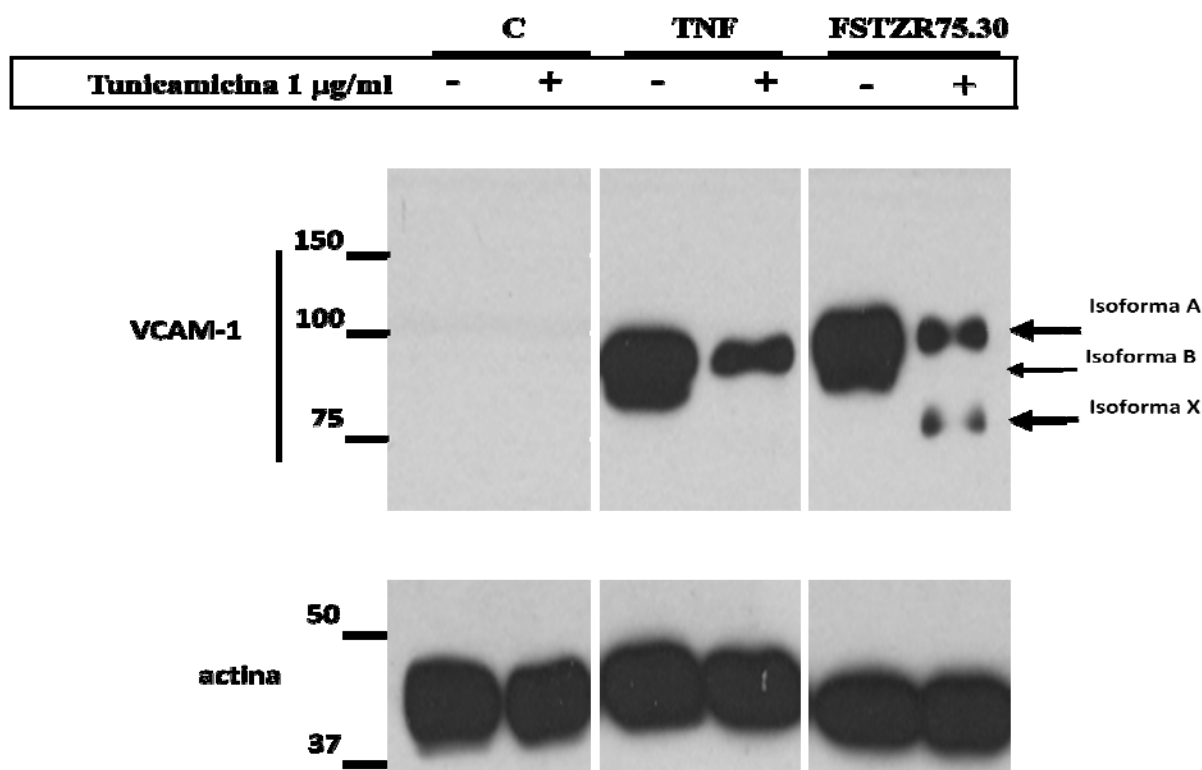


Figura 13. Western blot de la expresión de VCAM-1 en células endoteliales con y sin pretratamiento de tunicamicina y tratadas con TNF o con los FSTZR75.30 (panel superior). Tres isoformas de la molécula de adhesión fueron detectadas (flechas indicativas a la derecha de la imagen). En el panel inferior se observa el control de carga de actina. A la izquierda de ambos paneles, se observan las posiciones de los marcadores de peso molecular.

Los patrones proteicos fueron observados por fluorescencia utilizando la solución de Deep Purple™, la digitalización de las imágenes se realizó en un equipo Typhoon 9400™ y finalmente, el análisis de los patrones obtenidos se llevó a cabo con el

programa Image Master 2DPlatinum™ (Amersham Biosciences, UK) (**Figura 14**). Las imágenes representativas de los geles bidimensionales obtenidos se muestran a la izquierda de la figura 14, una vez que se realiza el análisis con el programa, podemos observar en los paneles de la derecha de la figura, todas las señales consideradas como proteínas que fueron expresadas por las células endoteliales, independientemente de los tratamientos.

El número total de manchas proteicas detectadas en los patrones bidimensionales fue de: 154 en las células control (C), 191 en las células tratadas con TNF (TNF) y 150 en las células tratadas con los FSTZR75.30 (FST).

La zona en la cual por sus características de puntos isoeléctricos y pesos moleculares, podrían ubicarse VCAM-1 y sus isoformas (~70-115 kDa/pI 4.2-5.2), fue de nuestro especial interés y quedó enmarcada con las herramientas de análisis como rectángulos punteados. Esta zona fue posteriormente amplificada y el resultado fue la definición de 16 manchas independientemente del tratamiento (**Figura 15**). Los tratamientos produjeron variaciones de intensidad entre ellos, en comparación con el control. (**Tabla 3**).

Algunas diferencias importantes entre los tratamientos fueron las siguientes: i) HUVECs tratadas con TNF presentaron 10 manchas que aumentaron su expresión, en comparación con las 5 manchas que aumentaron en las células tratadas con los FSTZR75.30; ii) el programa no pudo detectar a la proteína número 10, cuando las células fueron tratadas con los factores tumorales. Esta proteína podría ser interesante para futuros análisis; iii) la mancha número 6 tuvo los valores de peso molecular y punto isoeléctrico más cercanos para VCAM-1 “a” (81 kDa/pI 5.1), reportados por el NCBI (National Center for Bioinformatic Information). Sin embargo, esta mancha no aumentó su nivel de expresión en las células tratadas con los FSTZR75.30 como se observó anteriormente en los western unidimensionales.

pH 3-10



pH 3-10



Figura 14. Patrones bidimensionales de proteínas de extractos totales de HUVECs (50 μ g) control o tratadas con TNF o con los FSTZR75.30. Paneles de la izquierda: imágenes primarias derivadas de la digitalización de los geles teñidos. Paneles de la derecha: imágenes procesadas con el programa Image Master 2D Platinum. Los rectángulos delineados dentro de cada panel de la derecha, representan el área probable de ubicación de VCAM-1.

Figura 15. Patrones proteicos de extractos proteicos totales de HUVECs control y tratadas con TNF o con los FSTZR75.30 (paneles superiores). En el recuadro punteado fueron localizadas 16 manchas por el programa, que se ubican en el área donde por sus características podría estar localizada VCAM-1 (paneles inferiores). En la parte superior de los geles se muestra el rango de pH de separación para la primera dimensión. En el margen izquierdo, se muestra la ubicación de las bandas correspondientes al marcador de peso molecular.

Tabla 3. Dieciseis proteínas fueron detectadas en el área de la probable ubicación por peso molecular y punto isoeléctrico para VCAM-1. Las veces de aumento o disminución de expresión se determinaron a partir de los valores de área-intensidad de cada mancha, tomando como referencia a las manchas de geles de células control asignadas todas con un valor arbitrario de 1. Algunas manchas no presentaron cambios con respecto al control (=).

Valores en relación a control (1)

<i>spot</i>	<i>Mr (Da)</i>	<i>pI</i>	<i>TNF</i>	<i>TSFZR75.30</i>
1	104195	4.27	1.4	1.4
2	91003	4.24	0.9	1.2
3	102695	4.65	=	0.8
4	103944	4.88	0.9	1.2
5	89692	4.89	0.8	0.8
6	84228	5.10	1.2	=
7	96439	5.22	1.5	0.8
8	106487	5.27	0.9	0.6
9	112304	5.14	1.2	0.8
10	117016	4.84	0.8	not observable
11	123706	5.19	1.3	1.3
12	114497	5.46	1.1	0.7
13	74425	4.40	1.7	1.1
14	73949	4.73	1.1	0.8
15	73854	4.93	1.2	0.4
16	75000	5.22	1.2	0.7

3.7 Isoformas proteicas de VCAM-1 pueden observarse en westerns 2D de HUVECs tratadas con TNF o con los FSTZR75.30

La combinación de las técnicas de geles bidimensionales y western blot, nos permitió observar la expresión de isoformas de VCAM-1. **(Figura 16)**. La detección fue posible gracias a la alta resolución de separación y definición que puede realizar la electroforesis bidimensional de extractos totales celulares en proteínas individuales y, a la especificidad de reconocimiento a través de anticuerpos monoclonales en la inmunodetección.

La mancha que consideramos como la forma completa de VCAM-1 (A = ~90-95 kDa/pI 4.8), fue débilmente expresada en las células endoteliales control (panel izquierdo, figura 15-C). Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con TNF o con los FSTZR75.30, esta isoforma incrementó varias veces su expresión (50 y 60 veces, respectivamente). Debajo de esta isoforma A, en células tratadas, observamos dos manchas con pesos moleculares similares y con diferentes puntos isoeléctricos (B = ~80 kDa/pI 4.6 y C = ~83 kDa/pI 5.1-5.2). La expresión de las dos isoformas fue mayor en el tratamiento con los FSTZR75.30 (paneles izquierdos de la figura 15-T y 15-ZR). Finalmente, también en ambos tratamientos fue detectada una cuarta isoforma de VCAM-1 con un valor de punto isoeléctrico parecido a las anteriores isoformas pero con un peso molecular menor (D = ~77 kDa/pI 5.0). Esta isoforma fue apenas perceptible con el tratamiento de TNF, pero evidente con el tratamiento de los FSTZR75.30 (paneles izquierdos de la figura 15-T y 15-ZR).

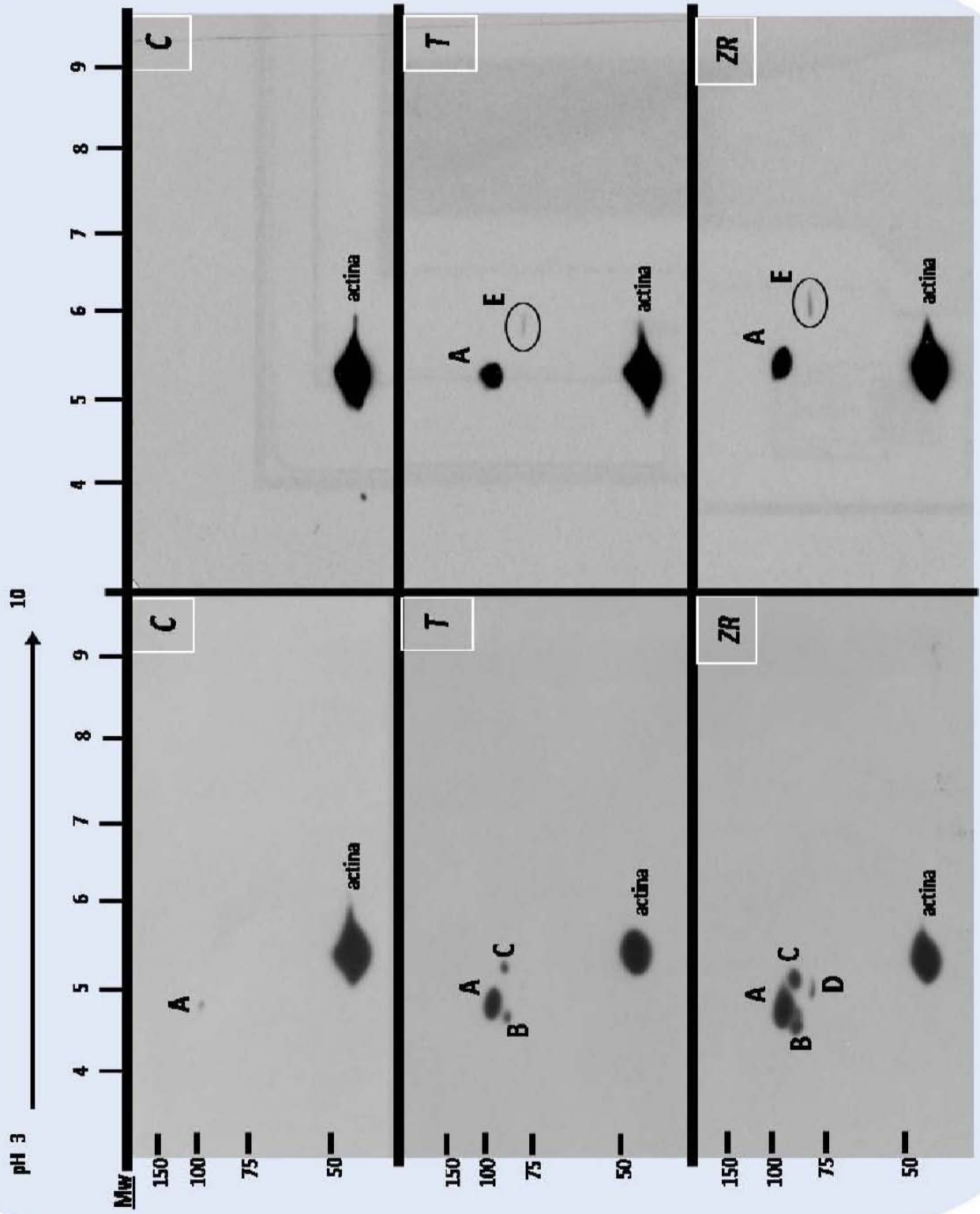
El pretratamiento con tunicamicina de las células endoteliales, provocó que algunas isoformas desaparecieran mientras que otras sólo fueron menos abundantes en los westerns bidimensionales. En el caso de las células control, la isoforma A de VCAM-1 ya no fue observable (panel derecho, figura 15-C). En las células tratadas con TNF o con los FSTZR75.30, la isoforma A de VCAM-1 disminuyó su expresión en

comparación con las células sin el pretratamiento de tunicamicina (0.6 y 0.3 veces, respectivamente) (paneles derechos, figura 15-T y 15-ZR). Con ambos tratamientos las isoformas B, C y D de VCAM-1 desaparecieron y apareció una quinta mancha proteica (E = ~77 kDa/pI 6,0) (paneles derechos de la figura 15-T y 15-ZR). Esta última isoforma tuvo el mismo peso molecular que D, pero con un punto isoeléctrico mucho más elevado correspondiente a una proteína más básica. Nuevamente, al igual que en el caso de las otras isoformas, la intensidad de expresión de esta isoforma E, fue mayor en el caso de las células endoteliales tratadas con los FSTZR75.30.

Figura 16. Expresión de isoformas de VCAM-1 en westerns bidimensionales a partir de extractos totales de células endoteliales control (C) o tratadas con TNF (T) o con FSTZR75.30 (ZR). Paneles izquierdos: células sin el pretratamiento de tunicamicina. Paneles derechos: células pretratadas con tunicamicina (1 µg/ml x 3 h). Margen superior: escala de pH de separación. Margen izquierdo: escala representativa de pesos moleculares. Las isoformas de VCAM-1 se nombraron de la “A” a la “E”.

Actina como control de cargado.

+ Tunicamycin 1 µg/ml



4. Discusión

La interacción de las células endoteliales y células tumorales a través de la secreción de factores solubles, se ha reconocido como un entorno relevante para la progresión tumoral durante fenómenos como la angiogénesis, intravasación de las células en el sitio del tumor primario, adherencia y extravasación en el sitio de metástasis. La información disponible indica que los factores secretados por las células tumorales pueden alterar el fenotipo de los diferentes tipos celulares que les rodean, modificando su actividad y provocando la destrucción de los tejidos que favorece la migración de las células y la metástasis (Katanasaka et al., 2007; Watts et al., 2002). Nuestro grupo de trabajo ha estado interesado en el estudio de las interacciones que conducen a la adhesión de células tumorales a células endoteliales, considerando este contacto como un paso previo a la extravasación que conduce a la invasión metastásica. Los antecedentes generados por nuestro grupo, han demostrado que las células humanas primarias derivadas de cordones umbilicales (HUVECs), tratadas con factores solubles tumorales secretados por células con potencial metastásico, pueden adherir células U937 expresando proteínas de adhesión en la superficie como: selectina E, ICAM-1 y VCAM-1, a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B (Estrada-Bernal et al., 2003).

La hipótesis actual de trabajo es que las células tumorales usan estas moléculas para adherirse e interactuar con las monocapas endoteliales que recubren el interior de las vénulas postcapilares, tal como lo hacen los leucocitos durante la reacción inflamatoria. Específicamente, en este trabajo recuperamos los factores solubles secretados por las líneas celulares de cáncer de mama humano: ZR75.30 (metastásica) y MCF-7 (no metastásica) para analizar por medio de westerns bidimensionales cambios en la expresión de VCAM-1. El uso de la tunicamicina, nos

permitió identificar isoformas N-glicosiladas en HUVECs tratadas con estos factores solubles tumorales.

La adhesión inducida por los factores solubles tumorales

Un ensayo de adhesión celular fue utilizado para comparar la activación que eran capaces de inducir diferentes factores solubles tumorales, derivados de líneas celulares de cáncer de mama humano con diferentes potenciales metastásicos, en células endoteliales. Dado que la activación endotelial por el factor de necrosis tumoral (TNF) es un proceso ya bien reconocido y documentado, esta citocina fue utilizada como un control positivo para evaluar la activación endotelial (Leeuwenberg et al., 1992; Lopez-Bojorquez et al., 2004; Sarrazin et al., 2006). El ensayo de adhesión demostró que los factores solubles tumorales de las líneas celulares ZR75.30 y MDA-MB 231 fueron tan eficaces como TNF en evocar una activación de las células endoteliales reflejada en un fenotipo pro-adhesivo. Los factores derivados de la línea celular MCF-7 no tuvieron un efecto significativo sobre las células endoteliales, cuando este se comparó con el control. Por otro lado, los factores tumorales derivados de las otras líneas que se probaron MDA-MB-435 y T47D sólo tuvieron un efecto intermedio sobre la activación de las HUVECs. Con base en estos resultados, nosotros elegimos a dos tipos de factores solubles tumorales: los derivados de la línea ZR75.30 (FSTZR75.30), que demostraron ser capaces de activar a las células endoteliales en forma indistinguible del TNF y los secretados por la línea MCF-7 (FSTMCF-7), que en el ensayo de adhesión se comportaron como el tratamiento control y para este trabajo, como un control negativo de la activación de las células endoteliales. En estos dos factores solubles tumorales, fue también analizada la abundancia relativa de 27 elementos entre

citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento a través del sistema Bio-Plex™ (Tabla 1).

Actualmente se cree que el fenómeno de la metástasis de células tumorales comparte muchas similitudes con el proceso de adhesión y extravasación de leucocitos durante la inflamación (Liang et al., 2007; Lu et al., 2006; Wang et al., 2004). La expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 en la superficie de las células endoteliales, en respuesta a la secreción de citocinas y quimiocinas por el tejido circundante, es esencial en la respuesta inflamatoria aguda y representa una clara señal de un fenotipo endotelial activado. Aunque selectina-E e ICAM-1 han sido ya hace algún tiempo relacionadas con la tumorigénesis, la presencia de VCAM-1 no ha sido tan estudiada hasta ahora. Sólo estudios recientes de microarreglos muestran sobreexpresión del mensajero de VCAM-1 en muestras de tejido de cáncer de mama (Anderson et al., 2008; Nuyten and van de Vijver, 2008; Ou et al., 2008; Schobesberger et al., 2008).

Activación y traslocación de NF- κ B por los factores solubles tumorales

Desde su descubrimiento en 1986 por Baltimore y cols., NF- κ B ha sido asociado con una variedad de funciones celulares normales como la inflamación; también se le ha asociado a estados patológicos como la progresión tumoral. Más de 200 genes han sido involucrados y descritos como regulados por NF- κ B incluyendo el de VCAM-1, muchos de estos genes han sido también asociados con el desarrollo de cáncer y reportados como constitutivamente activos en muchas metástasis (Benezra et al., 2003; Fu et al., 2004; Lopez-Bojorquez, 2004; Shen et al., 2008). Sin embargo, principalmente en las células normales, TNF y otras citocinas pro-inflamatorias son reconocidas como los más importantes estímulos fisiológicos de NF- κ B.

Los FSTZR75.30 fueron capaces de inducir la expresión de VCAM-1 en HUVECs en una magnitud similar a la inducida por el TNF y, aunque ambos estímulos activaron la traslocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo de las células endoteliales, hubo una clara diferencia entre ellos reflejada por una menor traslocación del factor de transcripción en las HUVECs tratadas con los FSTZR75.30. Se considera que la cantidad de NF- κ B detectado por electroforesis de retardo es proporcional a la cantidad de expresión de los genes que está regulando, desde esta perspectiva llama la atención que la señal de VCAM-1 inducida por el TNF o por los FSTZR75.30 es muy similar aunque la señal de NF- κ B para los factores tumorales es sólo la mitad de la que se induce por TNF. Es probable que la combinación de elementos contenidos en los factores tumorales de la línea ZR75.30, proporcione un estímulo complementario para la transcripción de VCAM-1 independiente de NF- κ B. Este estímulo implicaría el reclutamiento de otros factores de transcripción logrando así, alcanzar los niveles de expresión de la molécula de adhesión que se observan en las inmunodetecciones tipo western blot.

Patrones bidimensionales de proteínas inducidas por los factores solubles tumorales

Los tratamientos de TNF y TSFZR75.30 en HUVECs, indujeron una adhesión indistinguible entre ellos, a pesar de que la expresión de VCAM-1 y la traslocación de NF- κ B si presentaron diferencias discretas. Esto nos llevó a comparar patrones bidimensionales a partir de extractos totales proteicos. La electroforesis 2D ha servido como una herramienta eficaz de alta resolución para la identificación, clasificación y análisis de patrones de proteínas expresados en diferentes estados fisiológicos y patológicos así como de los mecanismos moleculares subyacentes (Celis et al., 1990; Gromov et al., 2002; Katanasaka et al., 2007; Patwa et al., 2008;

Ying-Tao et al., 2005).

El análisis preliminar de la cantidad total de proteínas detectadas en las células control y en las que fueron tratadas con los FSTZR75.30 reveló números muy similares (C = 154, FSTZR75.30 = 150), en comparación con las células tratadas con TNF que presentaron más proteínas (T = 191). Por la diferencia en el número de proteínas expresadas en los patrones 2D, consideramos posible que las células endoteliales estimuladas con los factores tumorales, podrían estar expresando sólo proteínas relevantes para llevar a cabo las interacciones con las células tumorales y por lo tanto no estarían requiriendo la expresión de proteínas que no participen en el proceso.

Del número total de proteínas expresadas por las HUVECs control o tratadas con TNF o con los FSTZR75.30, nosotros nos enfocamos en un área de los geles 2D de alto peso molecular y bajo punto isoelectrico, en la que VCAM-1 podría estar ubicada según su secuencia de aminoácidos (81 kDa/pI 5.1) reportados por el NCBI o por la literatura (90-110 kDa/pI 5.1) (Richard et al., 1999; Silva et al., 2006; Simiantonaki et al., 2002). De acuerdo con los valores de peso molecular y punto isoelectrico que asignó el programa que analiza las imágenes 2D (Image Master 2D-Platinum™), VCAM-1 podría corresponder a la mancha en posición número 6 dentro del área que marcamos con los rectángulos punteados. Sin embargo, ni esta mancha ni ninguna otra de las circundantes presentó los cambios de expresión observados en los experimentos de western blot que hicimos de VCAM-1.

Westerns 2D de VCAM-1 inducida por los factores solubles tumorales

La identificación de marcadores moleculares ligados a la malignidad y tropismo de células metastásicas ha guiado a una variedad de estudios moleculares en cáncer de

mama y en otras patologías oncológicas (Barrera Saldana et al., 2003; Ma et al., 2003; Ross et al., 2003). El interés en la identificación de marcadores endoteliales de vasos sanguíneos relacionados con el cáncer, condujo recientemente a la identificación de 11 de marcadores tumorales del endotelio (TEM's). Algunas de estas proteínas corresponden con miembros de las familias de moléculas de adhesión celular y VCAM-1 aparece más de una vez en este tipo de estudios (Anderson et al., 2008; Goncalves et al., 2008).

Los análisis proteómicos representan un método eficaz para caracterizar los cambios en la expresión de proteínas en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama (Boyd et al., 2008; Bruneel et al., 2003; Oh et al., 2004; Traxler et al., 2004; Ying-Tao et al., 2005). Sin embargo, la sensibilidad en la detección de proteínas a partir de extractos complejos, representa una limitación técnica. Las proteínas de superficie y en particular las moléculas de adhesión, pueden dar cuenta de información útil para distinguir sitios de invasión pero, debido a su baja abundancia, generalmente caen por debajo de los límites de detección.

Las inmunodetecciones tipo western blot a partir de geles bidimensionales (westerns 2D), representan la fusión de 2 metodologías en una herramienta útil para la resolución de isoformas proteicas (Celis and Gromov, 1999; Celis et al., 1998; Gromov et al., 2008). En este caso, VCAM-1 presenta variantes por el empalme de exones, diferentes modificaciones postraduccionales y además, una diferencia de expresión relativa. Con el uso de los westerns 2D, hemos sido capaces de visualizar isoformas de VCAM-1 que difieren en peso molecular y punto isoeléctrico a partir de un contexto total de proteínas celulares de HUVECs tratadas con TNF o TSFZR75.30. En el NCBI están reportadas dos variantes de membrana de VCAM-1: la isoforma "a" (81 kDa/pI 5.1) que corresponde a la variante completa de 739 residuos [número de acceso NCBI: NP_001069], y la isoforma "b" (71 kDa/pI 5.0) que tiene solo 647

residuos y que es generada por corte y empalme del RNA mensajero que elimina el exón 5 [número de acceso NCBI: NP_542413] (**Figura 17**).

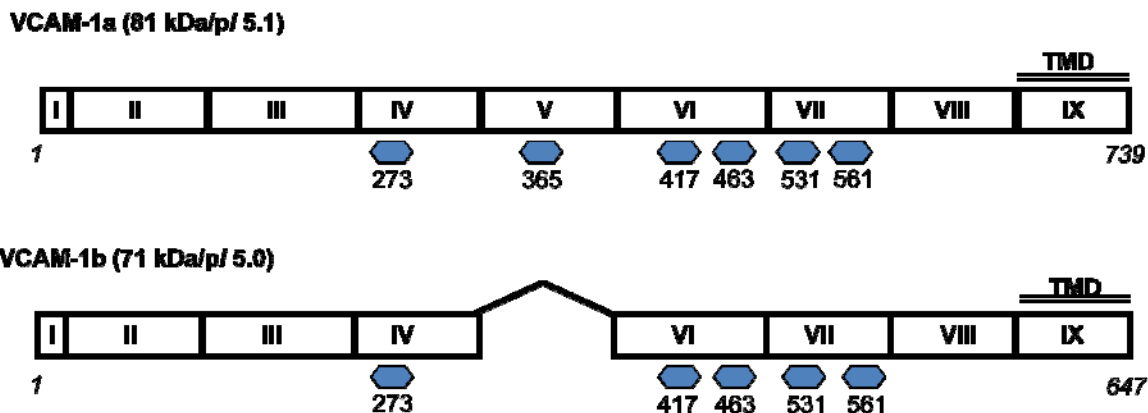


Figura 17. Mapas de exones para VCAM-1 “a” y VCAM-1 “b” según sus secuencias de aminoácidos reportadas por el NCBI. Los hexágonos debajo de los exones, representan los sitios de glicosilación que han sido determinados en las proteínas y su posición.

Por la posición relativa de las manchas observadas en los westerns 2D de las células endoteliales control o tratadas con TNF o con los FSTZR75.30, consideramos que VCAM-1 “a” corresponde con la isoforma que observamos de 90-95 kDa/pI 4.8 y que denominamos como A, mientras que VCAM-1 “b”, sólo se observó en los extractos de las células sometidas a los tratamientos y correspondería a la isoforma de 80 kDa/pI 4.6 la cual, denominamos como B. Dos isoformas más de VCAM-1 fueron perceptibles en los westerns 2D de HUVECs tratadas con TNF y con los FSTZR75.30: la isoforma C de 83 kDa/pI 5.1-5.2 y la isoforma D de 77 kDa/pI 5.0. La señal de ambas isoformas fue más intensa en los extractos de células tratadas con FSTZR75.30, particularmente la de la isoforma D.

Ya que las isoformas B y C se ubicaron prácticamente en el mismo rango de peso molecular, las diferencias que observamos en cuanto a los puntos isoeléctricos que

presentaron, las atribuimos a estados diferenciales de sialo-glicosilaciones, que han sido reportadas en el caso de VCAM-1 y que variarían la densidad de cargas en la proteína (Byrne et al., 2000; O'Hanlon et al., 2002). No podemos descartar que otros tipos de modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, fueran las responsables de las diferencias en los puntos isoeléctricos observados, sin embargo, este tipo de modificaciones postraduccionales no han descritas para VCAM-1 a la fecha.

Consideramos con uso potencial clínico en el futuro, la aparición de la isoforma *D*, ya que esta isoforma aumentó su expresión en forma muy significativa en las células tratadas con los FST75.30. Si esta isoforma se sobreexpresa en respuesta a los factores secretados por las células con potencial metastásico, podría servir como un marcador biológico que indicaría una activación anormal de las células endoteliales asociada a facilitar la diseminación tumoral local. Esta isoforma *D* tuvo el menor peso molecular de las isoformas observadas de VCAM-1, lo cual sugiere la presencia de una proteína generada por un empalme de exones o procesamiento proteolítico. Este empalme sería en principio diferente del que ya se conoce que presenta la isoforma "b" de VCAM-1 ya que, el resultado del empalme en el que se elimina al exón 5 conduce a la pérdida de sólo 11 kDa aproximadamente.

Westerns 2D de VCAM-1 en HUVECs pretratadas con tunicamicina

Las modificaciones postraduccionales son comunes en las proteínas de superficie que están en contacto con el medio extracelular y con otras células, tal es caso de las moléculas de adhesión, que permiten, a través de sus dominios de unión, el reconocimiento y la adhesión de células específicas. Las modificaciones postraduccionales conocidas de VCAM-1 consisten principalmente de adiciones de

ácidos siálicos en sitios de N-glicosilación (Miyoshi and Taniguchi, 2004; Zhang et al., 2005). Recientemente, estados diferenciales anormales de glicosilación han sido vinculados a una mayor diseminación tumoral. La importancia de estas modificaciones en las moléculas de adhesión con relación al cáncer o a la metástasis ha sido muy poco estudiada.

La isoforma “a” de VCAM-1 presenta 6 sitios con N-glicosilación, mientras que la isoforma “b” pierde uno de estos sitios por eliminación del exón 5. **Figura 17**. En un intento por definir si las nuevas isoformas de VCAM-1 observadas en los westerns unidimensionales y bidimensionales, corresponden a variantes N-glicosiladas, utilizamos tunicamicina (1 µg/ml) para lograr que sólo la porción proteica de las glicoproteínas pueda ser sintetizada al bloquear la formación de dolicolpifosfato sobre el que se depositan las N-glicosilaciones (Dwek and Brooks, 2004; Jin et al., 2004; Singh et al., 2004).

El pretratamiento con tunicamicina condujo a una disminución de la mitad del contenido de la isoforma A de VCAM-1 en células tratadas con TNF, en las células tratadas con los FSTZR75.30 la disminución fue todavía mayor, ambos en comparación con las células control. La inhibición de la N-glicosilación también llevó a la desaparición de la isoforma B expresada con los tratamientos de TNF o de los FSTZR75.30, estos efectos fueron confirmados en los western 2D. Se ha reportado que las proteínas que carecen de N-glicosilación no se pliegan adecuadamente y son menos estables, por lo que son exportadas del retículo endoplasmático para ser degradadas posteriormente en el citoplasma por el proteasoma. Esta es una probable explicación para la disminución que se observa en el contenido celular de la isoforma A y a la desaparición de la isoforma B en los westerns, tanto unidimensionales como bidimensionales.

En los westerns 2D de las HUVECs pretratadas con tunicamicina y, tratadas con TNF

o con los FSTZR75.30, se corroboraron nuestras observaciones en cuanto a la disminución de expresión de la isoforma A y, se mostró la desaparición no sólo de la isoforma B, sino también de las isoformas C y D. Consideramos interesante que con tunicamicina se indujo la expresión de una nueva isoforma que denominamos E, la cual, presenta el mismo peso molecular que la isoforma D de 77 kDa. **(Tabla 4)**. La diferencia en cuanto al pI entre D y E puede ser debida a una falta total de N-glicosilaciones en la isoforma E con lo cual, las cargas negativas de la proteína serían suprimidas y le permitirían ubicarse en un punto isoeléctrico más alto. Especulamos que la isoforma E podría ser la isoforma D desplazada hacia un rango más elevado de punto isoeléctrico de 6.0. Sin embargo, hay que considerar que la isoforma E podría generarse por otro tipo de empalme alternativo.

Basándonos en la estructura de exones de VCAM-1 valoramos el efecto de la eliminación de otros exones distintos al exón 5. Los empalmes alternativos que podrían generar una proteína hipotética que fuera la isoforma E presentarían los siguientes valores:

1. Eliminando el exón 2 que codifica para 92 residuos = 68928 kDa/pI 5.13
2. Eliminando el exón 3 que codifica para 107 residuos = 66997 kDa/pI 5.14
3. Eliminando el exón 8 que codifica para 89 residuos = 69376 kDa/pI 5.01

En todos los casos calculados, el peso molecular es menor al de la isoforma E (77 kDa). Estos cálculos sugieren que ninguna de las isoformas hipotéticas podría corresponder a la isoforma E que observamos en los westerns 2D de las HUVECs tratadas con TNF o con los FSTZR75.30 de 77 kDa/pI 6.0 y apoya nuestra idea de que esta isoforma E sea la isoforma D observada en las muestras sin el pretratamiento de tunicamicina.

Tabla 4. Resumen de las isoformas de VCAM-1 reportadas, así como de las isoformas observadas en nuestros experimentos por los tratamientos usados.

Isoforma	Mr/pI NCBI	Mr/pI observados por nuestros tratamientos	Mr/pI observados con el pretratamiento de tunicamicina + tratamientos
<i>a</i>	81 kDa/5.1	A = 90-95 kDa /4.8	A = 90-100 kDa /5.3-5.4
<i>b</i>	71 kDa /5.0	B = 80 kDa /4.6	No se observó
	No se ha reportado	C = 83 kDa /5.1-5.2	No se observó
	No se ha reportado	D = 77 kDa /5.0	No se observó
	No se ha reportado	No se observó	E = 77 kDa /5.8-6.1
<i>actina</i>	42 kDa /5.3	42 kDa /5.3	42 kDa /5.3

¿Quiénes podrían ser los responsables de los efectos producidos por los factores solubles tumorales sobre las HUVECs?

En el último medio siglo, numerosos estudios han abordado los efectos producidos por los factores solubles tumorales sobre las células endoteliales. Estos estudios han demostrado que las células malignas producen una serie de elementos entre los cuales destaca el VEGF que favorecen el crecimiento y la permeabilidad vascular del tumor facilitando la diseminación (Katanasaka et al., 2007; Pasioka et al., 2003). Proponemos que los efectos observados *in vitro* sobre las células endoteliales pueden reflejar lo que sucede *in vivo* entre las células tumorales y las células normales que las rodean. Este estudio ha detectado cambios sobre el fenotipo de las células endoteliales en respuesta al tratamiento con factores solubles tumorales,

que asemejan al fenotipo activado de estas células inducido por TNF durante la respuesta inflamatoria y que se encuentra bien descrito en la literatura. Los resultados muestran que las células tumorales con un alto potencial metastásico o invasivo, secretan factores más eficientes para la activación de vías de señalización que conducen a la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1, y por lo tanto, a una mayor capacidad adhesiva de las células endoteliales que en conjunto podrían facilitar la diseminación de células tumorales.

Con el uso de ensayos tipo ELISA como el sistema Bio Plex™, se realizó la búsqueda de elementos en los FSTZR75.30 que fueran los responsables de los efectos observados de adhesión, inducción de la expresión de VCAM-1 y traslocación de NF- κ B. Los FSTZR75.30 mostraron ser una mezcla proteica compleja de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, entre los cuales los más abundantes fueron cinco: IL-6, IL-8, G-CSF, MCP-1 y VEGF (33053, 24800, 28728, 27978, 11590 pg/ml, respectivamente). Fue muy interesante observar que los factores tumorales de la línea con bajo potencial metastásico FSTMCF-7, no contuvieron ninguno de los 27 factores que se analizaron, a pesar de que el análisis electroforético de estos dos tipos de factores, reveló patrones similares de bandas que sólo denotaron pequeñas diferencias para ambos preparados.

La activación endotelial inducida con los FSTZR75.30, es similar a la inducida por el TNF humano recombinante, a pesar de que el TNF está presente en muy baja abundancia en esta mezcla (9 pg/ml). Pensamos que la mezcla de elementos presentes en los FSTZR75.30 activa múltiples vías celulares que en combinación, dan lugar a los efectos similares a los producidos por el TNF. Aunque el sistema de NF- κ B sólo se activó aproximadamente un 50% en las HUVECs tratadas con los FSTZR75.30, en comparación al porcentaje del sistema activado por TNF, la expresión de VCAM-1 fue mayor, lo cual sugiere que el promotor de la proteína

podría estar siendo activado con la participación de otros factores de transcripción, reclutados por la mezcla de elementos presentes en los FSTZR75.30.

Estos resultados reflejan la naturaleza multifactorial de las señales emitidas por las células tumorales y su influencia en el comportamiento de las células que les rodea, incluyendo al endotelio. Los factores tumorales producidos por las líneas celulares con mayor potencial metastásico o invasivo de este estudio (ZR75.30 y MDA-MB-231), también tuvieron la más alta capacidad para inducir la adhesión de células U937 a las células endoteliales tratadas.

En este momento, no podemos descartar que otros elementos contenidos en los FSTZR75.30 y que no analizamos en el conjunto de 27 elementos del sistema Bio-Plex™, pudieran ser importantes para la activación endotelial. Aún así, esta combinación específica de elementos contenida en los factores solubles tumorales de la línea ZR75.30, podría servir como un sello que distinga a los tumores de cáncer de mama con características similares a las de esta línea, de otros tumores con menor capacidad invasiva.

4. Conclusiones

Este proyecto se enfocó a la identificación de biomarcadores de superficie celular en células endoteliales humanas que estuvieran involucrados con la diseminación tumoral. Las isoformas proteicas de VCAM-1 identificadas, podrían servir como marcadores de pronóstico, diagnóstico y opciones terapéuticas en la metástasis. Una parte importante a abordarse en el futuro, es la identificación de las proteínas receptoras para las isoformas de VCAM-1 en las células tumorales y, que en el caso de leucocitos corresponde a la integrina VLA-4. Igualmente importante, será definir las superficies estructurales y funcionales de contacto de estas interacciones entre las células tumorales y endoteliales con modelos animales que proporcionen un mejor entendimiento sobre el papel de las isoformas de VCAM-1 *in vivo*.

Aunque es conocido hace ya algún tiempo que el estado de glicosilación alterado, en particular el aumento de ácidos siálicos en las proteínas de superficie celular acompaña a la progresión tumoral, es sólo recientemente que el significado funcional de estos cambios ha comenzado a ser entendido y se ha asociado con la adhesión, movilidad e invasión de las células (Kannagi et al., 2004; Moniaux et al., 2004; Muller et al., 2004; Ono and Hakomori, 2004; Singh et al., 2004; Vlad and Finn, 2004; Zabalegui et al., 2004). Este estudio documenta que la alteración en el estado de glicosilación de proteínas de superficie observado en la diseminación tumoral, puede ser inducida en células normales expuestas a factores solubles tumorales derivados de células de cáncer de mama con potencial metastásico.

Responder si las isoformas de VCAM-1 pueden regular las interacciones entre células tumorales y células endoteliales y, si esto correlaciona con el potencial de diseminación tumoral, constituirán en un futuro un importante avance clínico para el manejo del cáncer.

5. Bibliografía

- Adem, C., Soderberg, C. L., Cunningham, J. M., Reynolds, C., Sebo, T. J., Thibodeau, S. N., Hartmann, L. C., Jenkins, R. B., 2003. Microsatellite instability in hereditary and sporadic breast cancers. *Int J Cancer*. 107, 580-582.
- Ajani, J., Allgood, V., 2005. Molecular mechanisms in cancer: what should clinicians know? *Semin Oncol*. 32, 2-4.
- Alexiou, D., Karayiannakis, A. J., Syrigos, K. N., Zbar, A., Sekara, E., Michail, P., Rosenberg, T., Diamantis, T., 2003. Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients. *Am J Gastroenterol*. 98, 478-485.
- Anderson, K. S., et al., 2008. Application of protein microarrays for multiplexed detection of antibodies to tumor antigens in breast cancer. *J Proteome Res*. 7, 1490-1499.
- Baker, S. G., Kramer, B. S., 2008. Using microarrays to study the microenvironment in tumor biology: the crucial role of statistics. *Semin Cancer Biol*. 18, 305-310.
- Banks, R. E., Gearing, A. J., Hemingway, I. K., Norfolk, D. R., Perren, T. J., Selby, P. J., 1993. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer*. 68, 122-124.
- Barrera Saldana, H., Martinez Garza, S., Ortiz Lopez, R., 2003. [The molecular diagnosis of cancer]. *Rev Invest Clin*. 55, 128-137.
- Benezra, M., Chevallier, N., Morrison, D. J., MacLachlan, T. K., El-Deiry, W. S., Licht, J. D., 2003. BRCA1 augments transcription by the NF-kappaB transcription factor by binding to the Rel domain of the p65/RelA subunit. *J Biol Chem*. 278, 26333-26341.
- Benoliel, A. M., Pirro, N., Marin, V., Consentino, B., Pierres, A., Vitte, J., Bongrand, P., Sielezneff, I., Sastre, B., 2003. Correlation between invasiveness of colorectal tumor cells and adhesive potential under flow. *Anticancer Res*. 23, 4891-4896.
- Bergamaschi, A., et al., 2008. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol*. 214, 357-367.
- Bernstein, B. E., Meissner, A., Lander, E. S., 2007. The mammalian epigenome. *Cell*. 128, 669-681.
- Bhati, R., et al., 2008. Molecular characterization of human breast tumor vascular cells. *Am J Pathol*. 172, 1381-1390.
- Boyd, Z. S., Wu, Q. J., O'Brien, C., Spoerke, J., Savage, H., Fielder, P. J., Amler, L., Yan, Y., Lackner, M. R., 2008. Proteomic analysis of breast cancer molecular subtypes and biomarkers of response to targeted kinase inhibitors using reverse-phase protein microarrays. *Mol Cancer Ther*. 7, 3695-3706.
- Brant-Zawadzki, P. B., Schmid, D. I., Jiang, H., Weyrich, A. S., Zimmerman, G. A., Kraiss, L. W., 2007. Translational control in endothelial cells. *J Vasc Surg*. 45 Suppl A, A8-14.
- Bruneel, A., Labas, V., Mailloux, A., Sharma, S., Vinh, J., Vaubourdolle, M., Baudin, B., 2003. Proteomic study of human umbilical vein endothelial cells in culture. *Proteomics*. 3, 714-723.
- Budhu, A., Wang, X. W., 2006. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc Biol*. 80, 1197-1213.
- Byrne, G. J., Ghellal, A., Iddon, J., Blann, A. D., Venizelos, V., Kumar, S., Howell, A., Bundred, N. J., 2000. Serum soluble vascular cell adhesion molecule-1: role as a surrogate marker of angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 92, 1329-1336.
- Celis, J. E., Gromov, P., 1999. 2D protein electrophoresis: can it be perfected? *Curr Opin Biotechnol*. 10, 16-21.
- Celis, J. E., Honore, B., Bauw, G., Vandekerckhove, J., 1990. Comprehensive computerized 2D gel protein databases offer a global approach to the study of the mammalian cell. *Bioessays*. 12, 93-97.
- Celis, J. E., Ostergaard, M., Jensen, N. A., Gromova, I., Rasmussen, H. H., Gromov, P., 1998. Human and mouse proteomic databases: novel resources in the protein universe. *FEBS Lett*. 430, 64-72.
- Ciernikova, S., et al., 2003. The novel exon 11 mutation of BRCA1 gene in a high-risk family. *Neoplasma*. 50, 403-407.
- Claes, K., Poppe, B., Machackova, E., Coene, I., Foretova, L., De Paepe, A., Messiaen, L., 2003. Differentiating pathogenic mutations from polymorphic alterations in the splice sites of BRCA1 and BRCA2. *Genes Chromosomes Cancer*. 37, 314-320.
- Costa, F. F., et al., 2004. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. *Oncogene*. 23, 1481-1488.
- Costelloe, C. M., et al., 2009. Imaging bone metastases in breast cancer: techniques and recommendations for diagnosis. *Lancet Oncol*. 10, 606-614.
- Chambers, A. F., Groom, A. C., MacDonald, I. C., 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2, 563-572.
- Chang, P. Y., Wu, T. L., Tsao, K. C., Li, C. C., Sun, C. F., Wu, J. T., 2005. Microplate ELISAs for soluble VCAM-1 and ICAM-1. *Ann Clin Lab Sci*. 35, 312-317.
- Chanrion, M., et al., 2008. A gene expression signature that can predict the recurrence of tamoxifen-treated primary breast cancer. *Clin Cancer Res*. 14, 1744-1752.

- Charpin, C., Garcia, S., Andrac, L., Horschowski, N., Choux, R., Lavaut, M. N., 1998. VCAM (IGSF) adhesion molecule expression in breast carcinomas detected by automated and quantitative immunocytochemical assays. *Hum Pathol.* 29, 896-903.
- Chavey, C., Muhlbauer, M., Bossard, C., Freund, A., Durand, S., Jorgensen, C., Jobin, C., Lazennec, G., 2008. Interleukin-8 expression is regulated by histone deacetylases through the nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer. *Mol Pharmacol.* 74, 1359-1366.
- Cheang, M. C., van de Rijn, M., Nielsen, T. O., 2008. Gene expression profiling of breast cancer. *Annu Rev Pathol.* 3, 67-97.
- Dejana, E., 2004. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5, 261-270.
- Dua, R. S., Gui, G. P., Isacke, C. M., 2005. Endothelial adhesion molecules in breast cancer invasion into the vascular and lymphatic systems. *Eur J Surg Oncol.* 31, 824-832.
- Dwek, M. V., Brooks, S. A., 2004. Harnessing changes in cellular glycosylation in new cancer treatment strategies. *Curr Cancer Drug Targets.* 4, 425-442.
- Estrada-Bernal, A., Mendoza-Milla, C., Ventura-Gallegos, J. L., Lopez-Bojorquez, L. N., Miranda-Peralta, E., Arechavaleta-Velasco, F., Vadillo-Ortega, F., Sanchez-Sanchez, L., Zentella-Dehesa, A., 2003. NF-kappaB dependent activation of human endothelial cells treated with soluble products derived from human lymphomas. *Cancer Lett.* 191, 239-248.
- Fu, M., Wang, C., Zhang, X., Pestell, R. G., 2004. Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 68, 1199-1208.
- Goepfert, C., Imai, M., Brouard, S., Csizmadia, E., Kaczmarek, E., Robson, S. C., 2000. CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. *Mol Med.* 6, 591-603.
- Goncalves, A., et al., 2008. Protein profiling of human breast tumor cells identifies novel biomarkers associated with molecular subtypes. *Mol Cell Proteomics.* 7, 1420-1433.
- Gromov, P., Celis, J. E., Gromova, I., Rank, F., Timmermans-Wielenga, V., Moreira, J. M., 2008. A single lysis solution for the analysis of tissue samples by different proteomic technologies. *Mol Oncol.* 2, 368-379.
- Gromov, P. S., Ostergaard, M., Gromova, I., Celis, J. E., 2002. Human proteomic databases: a powerful resource for functional genomics in health and disease. *Prog Biophys Mol Biol.* 80, 3-22.
- Harmey, J. H., Bucana, C. D., Lu, W., Byrne, A. M., McDonnell, S., Lynch, C., Bouchier-Hayes, D., Dong, Z., 2002. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *Int J Cancer.* 101, 415-422.
- Imyanitov, E. N., Hanson, K. P., 2003. Molecular pathogenesis of bilateral breast cancer. *Cancer Lett.* 191, 1-7.
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., Minick, C. R., 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 52, 2745-2756.
- Jin, X. L., Liu, H. B., Zhang, Y., Wang, B. S., Chen, H. L., 2004. Alteration in N -acetylglucosaminyltransferase activities and glycan structure in tissue and bile glycoproteins from extrahepatic bile duct carcinoma. *Glycoconj J.* 20, 399-406.
- 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.
- Kariya, Y., et al., 2008. N-Glycosylation of laminin-332 regulates its biological functions. A novel function of the bisecting GlcNAc. *J Biol Chem.* 283, 33036-33045.
- Katanasaka, Y., Asai, T., Naitou, H., Ohashi, N., Oku, N., 2007. Proteomic characterization of angiogenic endothelial cells stimulated with cancer cell-conditioned medium. *Biol Pharm Bull.* 30, 2300-2307.
- Kawaguchi, T., 2005. Cancer metastasis: characterization and identification of the behavior of metastatic tumor cells and the cell adhesion molecules, including carbohydrates. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 5, 39-64.
- Kim, I., Moon, S. O., Kim, S. H., Kim, H. J., Koh, Y. S., Koh, G. Y., 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-kappa B activation in endothelial cells. *J Biol Chem.* 276, 7614-7620.
- Kirshner, J., Schumann, D., Shively, J. E., 2003. CEACAM1, a cell-cell adhesion molecule, directly associates with annexin II in a three-dimensional model of mammary morphogenesis. *J Biol Chem.* 278, 50338-50345.
- Leeuwenberg, J. F., Smeets, E. F., Neefjes, J. J., Shaffer, M. A., Cinek, T., Jeunhomme, T. M., Ahern, T. J., Buurman, W. A., 1992. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology.* 77, 543-549.
- Li, A., Li, H., Jin, G., Xiu, R., 2003. A proteomic study on cell cycle progression of endothelium exposed to tumor conditioned medium and the possible role of cyclin D1/E. *Clin Hemorheol Microcirc.* 29, 383-390.
- Liang, M., Zhang, P., Fu, J., 2007. Up-regulation of LOX-1 expression by TNF-alpha promotes trans-endothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Lett.* 258, 31-37.
- Lieder, A. M., Prior, T. G., Wood, K. J., Werner, J. A., 2005. The relevance of adhesion molecules in the classification of

- squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res.* 25, 4141-4147.
- Lopez-Bojorquez, L. N., 2004. [Regulation of NF-kappaB transcription factor. A molecular mediator in inflammatory process]. *Rev Invest Clin.* 56, 83-92.
- Lopez-Bojorquez, L. N., Arechavaleta-Velasco, F., Vadillo-Ortega, F., Montes-Sanchez, D., Ventura-Gallegos, J. L., Zentella-Dehesa, A., 2004. NF-kappaB translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF-alpha and IL-1beta. *Inflamm Res.* 53, 567-575.
- Lu, H., Ouyang, W., Huang, C., 2006. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res.* 4, 221-233.
- Ma, G., Tabanca, N., Husnu Can Baser, K., Kirimer, N., Pasco, D. S., Khan, I. A., Khan, S. I., 2009. Inhibition of NF-kappaB-mediated transcription and induction of apoptosis in human breast cancer cells by epoxyseuoisoegenol-2-methyl butyrate. *Cancer Chemother Pharmacol.* 63, 673-680.
- Ma, P. C., Blaszkowsky, L., Bharti, A., Ladanyi, A., Kraeft, S. K., Bruno, A., Skarin, A. T., Chen, L. B., Salgia, R., 2003. Circulating tumor cells and serum tumor biomarkers in small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 23, 49-62.
- Matthies, H., Jr., Kretlow, J., Matthies, H., Smalla, K. H., Staak, S., Krug, M., 1999. Glycosylation of proteins during a critical time window is necessary for the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neuroscience.* 91, 175-183.
- Mendoza-Milla, C., Machuca Rodriguez, C., Cordova Alarcon, E., Estrada Bernal, A., Toledo-Cuevas, E. M., Martinez Martinez, E., Zentella Dehesa, A., 2005. NF-kappaB activation but not PI3K/Akt is required for dexamethasone dependent protection against TNF-alpha cytotoxicity in L929 cells. *FEBS Lett.* 579, 3947-3952.
- Michiels, C., 2003. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.* 196, 430-443.
- Mincey, B. A., 2003. Genetics and the management of women at high risk for breast cancer. *Oncologist.* 8, 466-473.
- Miyoshi, E., Taniguchi, N., 2004. [From proteomics to functional glycomics: importance of functional analysis of sugar chains]. *Seikagaku.* 76, 1337-1343.
- Moldovan, L., Moldovan, N. I., Sohn, R. H., Parikh, S. A., Goldschmidt-Clermont, P. J., 2000. Redox changes of cultured endothelial cells and actin dynamics. *Circ Res.* 86, 549-557.
- Moniaux, N., Andrianifahanana, M., Brand, R. E., Batra, S. K., 2004. Multiple roles of mucins in pancreatic cancer, a lethal and challenging malignancy. *Br J Cancer.* 91, 1633-1638.
- Moss, M. A., Zimmer, S., Anderson, K. W., 2000. Role of metastatic potential in the adhesion of human breast cancer cells to endothelial monolayers. *Anticancer Res.* 20, 1425-1433.
- Muller, I., Jenner, J., Handgretinger, R., Riberdy, J., Kerst, G., 2004. Glycosylation and lectins-examples of immunesurveillance and immune evasion. *Histol Histopathol.* 19, 527-533.
- Nuyten, D. S., van de Vijver, M. J., 2008. Using microarray analysis as a prognostic and predictive tool in oncology: focus on breast cancer and normal tissue toxicity. *Semin Radiat Oncol.* 18, 105-114.
- O'Hanlon, D. M., Fitzsimons, H., Lynch, J., Tormey, S., Malone, C., Given, H. F., 2002. Soluble adhesion molecules (E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1) in breast carcinoma. *Eur J Cancer.* 38, 2252-2257.
- Oh, P., Li, Y., Yu, J., Durr, E., Krasinska, K. M., Carver, L. A., Testa, J. E., Schnitzer, J. E., 2004. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature.* 429, 629-635.
- Okegawa, T., Li, Y., Pong, R. C., Hsieh, J. T., 2002. Cell adhesion proteins as tumor suppressors. *J Urol.* 167, 1836-1843.
- Ono, M., Hakomori, S., 2004. Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness. *Glycoconj J.* 20, 71-78.
- Ottini, L., et al., 2003. BRCA1 and BRCA2 mutation status and tumor characteristics in male breast cancer: a population-based study in Italy. *Cancer Res.* 63, 342-347.
- Ou, K., et al., 2008. Novel breast cancer biomarkers identified by integrative proteomic and gene expression mapping. *J Proteome Res.* 7, 1518-1528.
- Pasieka, Z., Stepien, H., Komorowski, J., Kolomecki, K., Kuzdak, K., 2003. Evaluation of the levels of bFGF, VEGF, sICAM-1, and sVCAM-1 in serum of patients with thyroid cancer. *Recent Results Cancer Res.* 162, 189-194.
- Patwa, T. H., Wang, Y., Miller, F. R., Goodison, S., Pennathur, S., Barder, T. J., Lubman, D. M., 2008. A novel phosphoprotein analysis scheme for assessing changes in premalignant and malignant breast cell lines using 2D liquid separations, protein microarrays and tandem mass spectrometry. *Proteomics Clin Appl.* 3, 51-66.
- Richard, C., Charreau, B., Vusio, P., Soulillou, J. P., Bouhours, J. F., 1999. Characterization of two monoclonal antibodies against porcine VCAM-1. *Hybridoma.* 18, 159-165.
- Ross, J. S., Linette, G. P., Stec, J., Clark, E., Ayers, M., Leschly, N., Symmans, W. F., Hortobagyi, G. N., Pusztai, L., 2003. Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn.* 3, 573-585.
- Sarrazin, S., et al., 2006. Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* 1765, 25-37.
- Schobesberger, M., Baltzer, A., Oberli, A., Kappeler, A., Gugger, M., Burger, H., Jaggi, R., 2008. Gene expression variation between distinct areas of breast cancer measured from paraffin-embedded tissue cores. *BMC Cancer.* 8, 343.
- Shen, Y., et al., 2008. Platinums sensitize human epithelial tumor cells to lymphotoxin alpha by inhibiting NFkappaB-

- dependent transcription. *Cancer Biol Ther.* 7, 1407-1414.
- Silva, H. C., Garcao, F., Coutinho, E. C., De Oliveira, C. F., Regateiro, F. J., 2006. Soluble VCAM-1 and E-selectin in breast cancer: relationship with staging and with the detection of circulating cancer cells. *Neoplasma.* 53, 538-543.
- Simiantonaki, N., Jayasinghe, C., Kirkpatrick, C. J., 2002. Effect of pro-inflammatory stimuli on tumor cell-mediated induction of endothelial cell adhesion molecules in vitro. *Exp Mol Pathol.* 73, 46-53.
- Singh, J., Itahana, Y., Knight-Krajewski, S., Kanagawa, M., Campbell, K. P., Bissell, M. J., Muschler, J., 2004. Proteolytic enzymes and altered glycosylation modulate dystroglycan function in carcinoma cells. *Cancer Res.* 64, 6152-6159.
- Smid, M., Wang, Y., Zhang, Y., Sieuwerts, A. M., Yu, J., Klijn, J. G., Foekens, J. A., Martens, J. W., 2008. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res.* 68, 3108-3114.
- Tesarova, P., Kvasnicka, J., Umlaufova, A., Homolkova, J., Kalousova, M., Tesar, V., 2003. [Soluble adhesion molecules in female patients with breast carcinoma]. *Cas Lek Cesk.* 142, 292-299.
- Thorne, R. F., Legg, J. W., Isacke, C. M., 2004. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in coordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci.* 117, 373-380.
- Traxler, E., Bayer, E., Stockl, J., Mohr, T., Lenz, C., Gerner, C., 2004. Towards a standardized human proteome database: quantitative proteome profiling of living cells. *Proteomics.* 4, 1314-1323.
- Vlad, A. M., Finn, O. J., 2004. Glycoprotein tumor antigens for immunotherapy of breast cancer. *Breast Dis.* 20, 73-79.
- Wang, X., Zhao, H., Andersson, R., 2004. Proteomics and leukocytes: an approach to understanding potential molecular mechanisms of inflammatory responses. *J Proteome Res.* 3, 921-929.
- Watts, M. E., Parkins, C. S., Chaplin, D. J., 2002. Influence of hypoxia and tumour-conditioned medium on endothelial cell adhesion molecule expression in vitro. *Anticancer Res.* 22, 953-958.
- Wehbe, H., Henson, R., Meng, F., Mize-Berge, J., Patel, T., 2006. Interleukin-6 contributes to growth in cholangiocarcinoma cells by aberrant promoter methylation and gene expression. *Cancer Res.* 66, 10517-10524.
- Wu, J. M., et al., 2008. Heterogeneity of breast cancer metastases: comparison of therapeutic target expression and promoter methylation between primary tumors and their multifocal metastases. *Clin Cancer Res.* 14, 1938-1946.
- Yan, B., Wang, H., Rabbani, Z. N., Zhao, Y., Li, W., Yuan, Y., Li, F., Dewhirst, M. W., Li, C. Y., 2006. Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Res.* 66, 11565-11570.
- Ying-Tao, Z., Yi-Ping, G., Lu-Sheng, S., Yi-Li, W., 2005. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between metastatic and non-metastatic human colorectal carcinoma cell lines. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 17, 725-732.
- Yoneda, T., 2000. Cellular and molecular basis of preferential metastasis of breast cancer to bone. *J Orthop Sci.* 5, 75-81.
- Yu, L. G., et al., 2007. Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion. *J Biol Chem.* 282, 773-781.
- Zabalegui, N., et al., 2004. Acquired potential N-glycosylation sites within the tumor-specific immunoglobulin heavy chains of B-cell malignancies. *Haematologica.* 89, 541-546.
- Zhang, H., et al., 2005. High throughput quantitative analysis of serum proteins using glycopeptide capture and liquid chromatography mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 4, 144-155.

Abreviaturas

Células endoteliales humanas de la vena de cordones umbilicales-Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

Factores solubles tumorales (FST)

Factor de necrosis tumoral (TNF)

Molécula de adhesión vascular endothelial-Vascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1)

Electroforesis bidimensional-Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D PAGE)

Punto isoeléctrico (pI)

National center for bioinformatic information (NCBI)

Factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B)

Molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1)

Ensayos electroforéticos de retardo-Electrophoretic mobility supershift assays (EMSA)

Líneas celulares tumorales:

U937, ZR75.30, MDA-MB 231, MDA-MB 435, T47-D, MCF-7.

Isoformas de VCAM-1:

“a”, isoforma completa de VCAM-1 reportada por el NCBI

“b”, isoforma corta de VCAM-1 reportada por el NCBI

ANEXOS

Uno de los placeres más grandes de la vida es hacer aquello que otros aseguran es imposible.

1. SOLUCIONES

Solución		
amortiguadora de		1 L
Fosfatos (PBS)		
<i>NaCl</i>	137 mM	8 g
<i>KCl</i>	2.7 mM	0.2 g
<i>KH₂PO₄</i>	4.3 mM	0.2 g
<i>Na₂HPO₄ anhidro</i>	1.4 mM	2.16 g
		(pH = 7.2-7.4)

Esterilizar en autoclave y mantener a temperatura ambiente o bien a 4°C

Solución de Verseno		1 L
<i>NaCl</i>	136 mM	8 g
<i>Tris</i>	28 mM	3.04 g
<i>KCl</i>	5.4 μM	0.4 g
<i>EDTA</i>	0.5 μM	0.2 g
		(pH = 7.7)

Esterilizar en autoclave y mantener a temperatura ambiente hasta que sea mezclado con la tripsina, esterilizar la mezcla por filtración y hacer alícuotas que se guardan a -20°C o bien, en refrigeración para uso continuo

Tripsina 0.1%

1 g de tripsina en 1 L de solución de verseno

Líquido de centelleo		1 L
<i>PPO</i>	32 mM	7 g
<i>POPOP</i>	14 μM	0.5 g
<i>Tolueno</i>	65%	65%
<i>Tritón x-100</i>	35%	35%

Preparar y dejar agitando toda la noche, almacenar a temperatura ambiente

Amortiguador de lisis para extracción de proteínas totales (RIPA)		50 ml
<i>NP-40</i>	0.1%	50 μ l
<i>Deoxicolato de Na</i>	0.5%	250 mg
<i>SDS</i>	0.1%	50 mg
<i>PMSF</i>	1 mM	50 μ l (stock 100 mM)
<i>NaOV</i>	1mM	50 μ l (stock 100 mM)
<i>Mezcla de Inhibidores (Sigma)</i>		50 μ l

Preparar en PBS pH 7.2-7.4 y almacenar a 4°C hasta su uso. Los inhibidores de proteasas se colocan hasta el momento de realizar la lisis celular

Amortiguador de corrida para proteínas 10x		1 L
<i>Glicina</i>	1.9 M	144 g
<i>Tris-base</i>	250 mM	30.2 g
<i>SDS</i>	35 mM	10 g
		(pH = 8.3)

Amortiguador para cargado de proteínas Laemmli 5x**10 ml**

<i>Tris-HCl (stock 0.5 M pH 6.8)</i>	125 mM	6 ml
<i>SDS</i>	10%	1 g
<i>glicerol</i>	25%	2.5 ml
<i>Azul de bromofenol</i>	0.1%	2 mg
<i>β mercaptoetanol</i>	0.5%	500 μl
<i>H₂O_{bd}</i>	0.5%	500 μl

Preparar y congelar en alícuotas a -20°C hasta su uso

Amortiguador de lisis de proteínas para 2D**10 ml**

<i>Urea</i>	9 M	5.40 g
<i>CHAPS</i>	2%	200 mg

Disolver primero la urea y después agregar el CHAPS. Almacenar a -20°C y descongelar en el momento de uso

Amortiguador de transferencia de proteínas**1 L**

<i>Glicina</i>	193 mM	14.5 g
<i>Tris</i>	25 mM	3 g
<i>Metanol</i>	PVDF 10%	100 ml
	Nitrocelulosa 20%	200 ml

Almacenar a 4°C hasta el momento de su uso

Solución de Equilibrio**para 2D****50 ml**

<i>Urea</i>	6 M	18.01 g
<i>Tris-HCl (pH 8.8)</i>	50 mM	3.33 ml (stock 1.5 M)
<i>glicerol</i>	30%	15 ml
<i>SDS</i>	2%	1 g

Almacenar a temperatura ambiente y agregar 70 mM de DTT para el proceso de equilibrio I o bien, 140 mM de Iodoacetamida para el equilibrio II

Amortiguador de TBS**para membranas****1 L**

<i>NaCl</i>	150 mM	8.76 g
<i>Tris</i>	20 mM	2.42 g
		pH 7.5

Solución para despegar**anticuerpos de****membranas (stripping)****100 ml**

<i>Tris-HCl (pH 6.8)</i>	62.5 mM	12.5 ml (stock 0.5 M)
<i>SDS</i>	2%	2 g
<i>β Mercaptoetanol</i>	100 mM	780 μ l

Amortiguador de corrida**para EMSA (TBE 1x)****1 L**

<i>Tris</i>	89 mM	10.8 g
<i>Acido bórico</i>	89 mM	5.5 g
<i>EDTA (di-tetrasódica)</i>	2 mM	8 ml
		pH 8.0

AMORTIGUADORES PARA EXTRACTOS NUCLEARES

Solución "A" hipotónica			
	[FINAL]	[Solución Madre]	PARA 25 µl
HEPES pH 7.9	10 mM	1 M	250 µl
KCl	10 mM	3M	83.3 µl
MgCl ₂	1.5 mM	200 mM	187.5 µl
H ₂ O	----	---	24.47 ml
DTT	1 mM	1 M	Agregar 1 µl/ml justo antes de usar
Solución "C" hipertónica			
	[FINAL]	[Solución Madre]	PARA 25 ml
HEPES pH 7.9	20 mM	1 M	500 µl
NaCl	0.4 mM	1 M	10 ml
MgCl ₂	1.5 mM	200 mM	187.5 µl
Glicerol	25%	100 %	6.25 ml
EDTA	0.2mM	250 mM	20 µl
H ₂ O	---	---	8.23 ml
DTT	1 mM	1M	Agregar 1 (µl/ml justo antes de usar
PMSF	0.5 mM	100 mM	Agregar 5 (µl/ml justo antes de usar
Solución "D" para conservación de las proteínas			
	[FINAL]	[Solución Madre]	PARA 20 ml
HEPES pH 7.9	20 mM	1 M	400 µl
KCl	0.4 mM	3M	330 µl
Glicerol	20%	100 %	4 ml
EDTA	0.2 mM	250 mM	16 µl
H ₂ O	---	---	15.25 ml
DTT	1 mM	1 M	Agregar 1 µl/ml justo antes de usar
PMSF	0.5 mM	100 mM	Agregar 5 µl/ml justo antes de usar

2. PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN

Cultivo de células endoteliales a partir de la vena de cordones umbilicales humanos (HUVECs)

1. Los cordones umbilicales se colectan y deben mantenerse en solución salina fisiológica estéril fría (PBS-frío) con 0.1% de antibiótico-antimicótico, dentro de un recipiente estéril hasta su uso (máximo 24 h después de su obtención)
2. Trabajar en esterilidad sobre una base de papel
3. Limpiar el cordón con gasas
4. Canular la vena del cordón
5. Cerrar con unas pinzas portaagujas
6. Lavar dos veces con solución salina y exprimir
7. Amarrar los extremos con cinchos de electricista
8. Rellenar con una jeringa llena de tripsina al 0.1% preparada en solución de verseno o bien, colagenasa tipo II al 0.02% disuelta en una solución de HEPES
9. Incubar a 37°C por 15 min a baño María, sumergido en un vaso con solución salina
10. Sacar del baño, apretar nuevamente los cinchos y dar masaje
11. Cortar con cuidado el cincho sin cánula y colocar el relleno en un tubo con un poco de suero
12. Enjuagar una vez con solución salina y también recolectarlo
13. Retirar la jeringa, pinzas, cinchos y desechar el cordón

14. Centrifugar el recolectado a 15,000 rpm por 10 min
15. Resuspender el botón obtenido en medio M-199 suplementado y sembrar una mezcla uniforme en placas de Petri de 100 mm
16. Cambiar el medio al siguiente día

Obtención de factores solubles derivados de células tumorales

1. Crecer las células tumorales a confluencia en botellas de 75 cm²
2. Lavar de 6-10 veces la monocapa de células con PBS con Ca²⁺Mg²⁺ para evitar el despegado de las células de la botella de cultivo
3. Colocar aproximadamente 10 ml de medio sin suero por 48 h para que las células secreten los factores necesarios para su supervivencia
4. Recuperar el medio a las 48 h de todas las botellas cultivadas y centrifugar la mezcla a 2000 rpm x 45 min
5. Recuperar el sobrenadante del centrifugado y congelar a -70°C
6. Liofilizar el congelado
7. Reconstituir el polvo liofilizado en una décima parte del volumen original para concentrar los factores secretados por las células
8. Centrifugar a 5000 rpm por 1 h a 4°C para empaquetar todo el material insoluble en un pellet
9. Recuperar los sobrenadantes y colocar en una membrana de celulosa para diálisis (poro de 3'500-10'000 kDa)
10. El dializado se hace 2 veces de 12 h mínimo cada uno, con 1.5-2 L de solución salina al 0.9% en un matraz con agitación a 4°C
11. Recuperar el medio condicionado de la membrana de diálisis y centrifugar a 5000 rpm por 1 h a 4°C

12. Finalmente, pasar el sobrenadante obtenido en filtros de membrana de $.22\mu\text{m}$ y conservar en alícuotas a 4°C hasta su utilización

Ensayo de adhesión *in vitro* entre células endoteliales y células U937

1. Se siembran aproximadamente 30×10^3 células endoteliales por pozo (placa de 48 pozos) en un volumen de 500 μl de M-199 de forma homogénea
2. Estos pozos estarán confluentes de células endoteliales en aproximadamente una semana, listos para colocar los tratamientos y realizar el ensayo
3. Retirar el medio de cultivo de los pozos
4. Los tratamientos se agregan a las placas de 48 pozos previamente diluïdos o mezclados con M-199 y se incuban por 3 h
5. Al término de este tiempo se retira el medio de cultivo y se colocan 250,000 células tumorales (U937) previamente marcadas con timidina tritiada ($1 \mu\text{Ci/ml}$) por 48h
6. La co-incubación entre las células se permite por 3 hrs más
7. Al finalizar este tiempo, el medio y todas las células U937 no adheridas se retiran lavando los pozos 2 veces con PBS ($\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$)
8. Para una cuantificación precisa las células en interacción, se rompen y el DNA es hidrolizado con una solución de NaOH 200 mM por 48 h a 37°C
9. La radioactividad se cuantifica en un contador de centelleo, transfiriendo el sobrenadante a un vial con 3 ml de líquido de centelleo

10. El 100% de la adhesión se considera como la radioactividad presente en las 250,000 células tumorales agregadas por pozo para la co-incubación con las células endoteliales

Marcado de las células U937 con timidina radiactiva

1. Recuperar todo el medio RPMI que contiene a las células U937 en cultivo en tubos nuevos y centrifugar a 1500 rpm por 6-8 min
2. Retirar el sobrenadante
3. Se siembran células U937 en placas de Petri con medio RPMI, calculando que a las 48 h recuperemos suficientes células como para colocar 250, 000 por pozo para estar en contacto con las células endoteliales en el ensayo
4. Se colocan aproximadamente 10 ml de medio en cada placa de Petri conteniendo las células U937 y se agrega la timidina tritiada llegando a una concentración de 1 μ Ci/ml
5. A las 48 h se recupera todo el medio con las células U937, centrifugar a 1500 rpm por 10 min y después retirar el sobrenadante
6. Repetir el paso anterior
7. Finalmente, resuspender el pellet en medio M-199 suficiente para agregar 300 μ l del homogeneizado de células U937 a los pozos que contienen a las células endoteliales tratadas

8. Tomar en 3 momentos distintas alícuotas de la solución para obtener el 100% de las U937 agregadas y poder cuantificar la radiactividad total colocada por pozo

NOTA: tener cuidado de manejar y desechar apropiadamente todo el material utilizado que haya tenido contacto con la radiactividad.

Lisado de células en cultivo para obtener proteína total y cuantificación con el método de Bradford

1. A la par de la cuantificación de muestras, es necesario hacer una cuantificación de una curva patrón con un stock que contenga 1 o 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de albumina
2. La curva de albúmina lleva entonces los siguientes puntos: 0, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
3. Colocar 800 μl de agua en tubos eppendorf de 1.5 ml, agregar 0, 2, 4, 8, 16 μl de albúmina y dar vortex
4. Colocar 800 μl de agua en tubos eppendorf de 1.5 ml, agregar de 3-5 μl de las muestras que se deseen cuantificar y dar vortex
5. Colocar 200 μl de reactivo Bradford por muestra y dar vortex
6. Colocar la mezcla en celdas plásticas y medir a 595 nm en el espectrofotómetro para obtener la absorbancia de las muestras
7. La intensidad del color obtenido en la mezcla, será proporcional a la cantidad de proteína contenida en las muestras, entre más intensidad de color, mayor cantidad de proteína contenida en la muestra
8. Hacer los cálculos por regresión lineal para obtener la concentración de los $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína contenida en nuestras muestras

GELES BIDIMENSIONALES

Corrida de tiras en 1ª dimensión en el equipo de isoelectroenfoque (IPGphor Amersham-Biosciences)

Sólo se permite la corrida de tiras iguales, es decir: tiras del mismo rango de pH, carga de proteína igual, procesamiento de muestras igual, precipitación y/o concentración. Todo esto es con la finalidad de que las tiras tengan una conductividad igual o muy parecida durante la corrida y por lo tanto, la reproducibilidad sea óptima y confiable.

Rehidratación de las tiras de pH inmovilizado

Se realiza en la charola plástica de rehidratación nivelada. El volumen y concentración máximo de muestra que se coloca, dependerá del tipo de tiras que se utilicen.

El buffer de rehidratación (De Streak™) debe ser mezclado con los anfolitos del mismo rango de pH que las tiras que se van a correr, enseguida mezclar con nuestra muestra de proteína. Sólo hay que cuidar que la relación de muestra-De streak, sea mínimo de 1:1 con la muestra.

Las muestras mezcladas, se colocan finalmente sobre cada carril de la charola. Tener en cuenta el tamaño de la tira y depositar toda la muestra por lo menos 1 cm antes del final de la tira.

Tomar los extremos de las tiras con las pinzas, cada tira viene protegida con una cubierta posterior plástica, hay que identificarla y retirarla (todo se hace con las pinzas y sosteniendo las tiras de forma firme).

Colocar cada tira con el gel hacia abajo sobre la muestra y evitando la formación de burbujas, hay que checar que no queden burbujas a contraluz. Repetir el procedimiento con todas las muestras una por una.

Colocar despacio aceite mineral encima de cada tira hasta cubrir todo el carril, nunca directamente sobre la tira y la muestra. De lo contrario, la muestra será desplazada con el aceite y ya no podrá ser absorbida.

Tapar la charola con cuidado y dejar que la rehidratación se lleve a cabo por 10 h mínimo o bien, 18 h máximo a temperatura ambiente.

Primera Dimensión

Para comenzar la separación de las proteínas de la muestra por punto isoeléctrico o primera dimensión, tomar de la charola de rehidratación con pinzas las tiras una por una y escurrir el exceso de aceite mineral.

Colocar la tira con el gel hacia arriba sobre la charola de porcelana para la corrida. El límite azul del gel de la tira, debe quedar sobre el punto dorado de la charola que indica el tamaño de la tira.

El signo positivo de la tira va con el lado positivo de la charola.

Colocar weeks humedecidos (mechas de papel filtro) con 150 μ l de agua bd en cada lado de las tiras, el week debe tocar una pequeña parte del gel en la tira.
Colocar aceite mineral hasta llenar la charola (se puede reutilizar el que se uso para la rehidratación). MUCHO CUIDADO DE QUE NO SE REBALSE EL ACEITE.
Hay que checar que no haya burbujas sobre las tiras, si las hubiera, hay que tratar de retirarlas suavemente con las pinzas.
Colocación de los soportes que contienen a los electrodos: checar que estén en posición abierta es decir, con los seguros de los extremos abiertos. Colocar los electrodos encima de los weeks con mucho cuidado para ya no mover ni los weeks ni las tiras. Los postes de oro que están en los extremos del soporte, deben hacer contacto con las planchas doradas del aparato. Fijar los soportes de los electrodos, colocando los dedos en medio, presionando ligeramente y cerrando los seguros laterales.
Las condiciones de corrida dependerán del tamaño de las tiras y del pH que estamos usando (indicaciones en el empaque de las tiras).

Equilibrio de las tiras

Una vez finalizada la corrida de la primera dimensión, hay que retirar los electrodos y los weeks para colocar las tiras una por una en tubos de vidrio de tamaño adecuado con tapas herméticas, para iniciar el proceso de equilibrio.

- 1) Incubar cada tira durante 15 min en una solución de equilibrio con 70 mM de DTT en agitación suave y constante
- 2) Incubar 15 min en una solución de equilibrio con 140 mM de IA en agitación suave y constante.

En las dos incubaciones hay que asegurarse que la solución de equilibrio baña la tira constantemente.

Después de la segunda incubación tomar la tira con pinzas y enjuagarla con el amortiguador de electroforesis de proteínas 1x por unos minutos, para después ser inmediatamente colocada sobre el gel que separará las proteínas en la segunda dimensión.

Segunda Dimensión

La separación por peso molecular o segunda dimensión se realiza con geles separadores de poliacrilamida al porcentaje conveniente. En particular en este proyecto, la concentración usada fue del 10%.

Tomar las tiras con las pinzas por uno de sus extremos y ajustarlas al tamaño del gel, cortando con mucho cuidado aproximadamente hasta 1 mm de la tira-gel en ambos lados y depositarla de forma horizontal sobre el gel.

El signo positivo de la tira puede ser colocado en el lado donde se ubica el pozo para el marcador de peso molecular comercial como punto de referencia. La cara plástica de la tira quedará en contacto con el vidrio más grande.

Inmovilizar la tira colocada sobre el gel con agarosa al 0.1% disuelta en buffer de corrida de proteínas 1x, ligeramente teñida con azul de bromofenol, evitar la formación de burbujas.

Aplicar entre 100-120 v, por el tiempo que sea conveniente para la separación de las proteínas de la muestra. La principal guía de separación será el patrón de bandas de diferente peso molecular desplegado por el marcador comercial que se colocó.

El patrón de proteínas obtenido en los geles bidimensionales se observa por medio de la tinción de los geles con nitrato de plata, azul de Coomasie o fluoróforos.

Transferencia húmeda de proteínas para realizar inmunodetección tipo Western-blot

1. Correr geles desnaturalizantes SDS-PAGE de acuerdo a las condiciones que convengan y terminada la corrida, desmontar los geles de la cámara de electroforesis y colocarlos en el buffer de transferencia con 10% de metanol por 10'
2. Recortar papel filtro y membrana de transferencia de acuerdo al tamaño del gel o bien, de acuerdo al tamaño del área del gel que se quiera transferir (4 papeles delgados y 1 membrana por gel)
3. Activar la membrana de transferencia de acuerdo a las especificaciones del fabricante
4. Armado del "sandwich" de transferencia: remojar 2 papeles filtro en el amortiguador para transferencia y colocarlos uno por uno sobre la esponja, aplanar para que no queden burbujas de aire entre ellos; colocar el gel (marcador del lado derecho, para que encima se coloque la membrana y al momento de voltearla después de la transferencia queden los pozos en el orden en que fueron cargados) y aplanar contra los papeles filtro para sacar también las burbujas de aire; encima se coloca la membrana activada y se sacan las burbujas de aire; colocar encima de la membrana 2 papeles filtro mas,

nuevamente se colocan uno por uno y humedecidos en el amortiguador sacando las burbujas de aire

5. Cerrar firmemente el armazón evitando que el contenido se mueva
6. Armar la cámara de corrida con los armazones y refrigerante para comenzar la transferencia de acuerdo a las condiciones de corriente y voltaje que recomiende el fabricante
7. Terminada la transferencia, hay que remover los papeles filtro y tomar la membrana con pinzas para colocarla en un recipiente con una solución de TBS
8. A partir de este momento, no dejar en ningún momento que la membrana se seque durante el experimento, siempre debe tener líquido humedeciéndola

TODOS LOS SIGUIENTES PASOS SE REALIZAN EN AGITACIÓN

9. Bloquear la membrana con leche al 5% o con albúmina al 0.1% por 1 h, en una solución de TBS-Tween 20
10. Colocar el anticuerpo primario diluído en TBS-Tween 20 con 0.1% de albúmina por 1 h o bien, toda la noche en TBS-Tween 20 con 3% de albúmina. En cualquiera de los dos casos, la membrana con la solución de anticuerpo es mantenida a 4°C
11. Hacer 3 lavados de 10 min cada uno y 2 de 5 min con TBS-Tween 20
12. Colocar el anticuerpo secundario diluído en TBS-Tween 20 con 5% de leche por 1 h
13. Hacer 3 lavados de 10 min cada uno y 2 de 5 min con TBS-Tween
14. Finalmente hay que hacer un último lavado de la membrana con TBS ya sin Tween 20
15. Colocar el luminol o sustrato comercial de elección sobre la membrana por 5 min
16. Colocar las membranas dentro de superficies plásticas y fijarlas en el cassette para revelar a diferentes tiempos con placa fotográfica

3. Bioinformática de VCAM-1

VCAM-1 ISOFORMA "A"

LOCUS NM_001078 3119 bp mRNA linear PRI 06-APR-2008

DEFINITION Homo sapiens vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1), transcript variant 1, mRNA.

ACCESSION NM_001078

VERSION NM_001078.2 GI:18201907

SOURCE Homo sapiens (human)

KEYWORDS 3D-structure; Alternative splicing; Cell adhesion; Direct protein sequencing; Glycoprotein; Immunoglobulin domain; Membrane; Polymorphism; Repeat; Signal; Transmembrane.

Summary:

This gene is a member of the Ig superfamily and encodes a cell surface sialoglycoprotein expressed by cytokine-activated endothelium. This type I membrane protein mediates leukocyte-endothelial cell adhesion and signal transduction, and may play a role in the development of atherosclerosis and rheumatoid arthritis. Two alternatively spliced transcripts encoding different isoforms have been described for this gene.

Transcript Variant:

This variant (1) encodes the predominant, full-length isoform (a)

ORIGIN

```
1  cgcgggatct  gcatcggggc  tcaactggctt  caggagctga  ataccctccc  aggcacacac
61  aggtgggaca  caaataaggg  ttttggaaac  actatcttct  catcacgaca  gcaacttaaa
121  atgcctggga  agatggtcgt  gatccttgga  gcctcaaata  tactttggat  aatgtttgca
181  gcttctcaag  cttttaaata  cgagaccacc  ccagaatcta  gatatcttgc  tcagattggt
241  gactccgtct  cattgacttg  cagcaccaca  ggctgtgagt  cccattttt  ctcttggaga
301  acccagatag  atagtccact  gaatgggaag  gtgacgaatg  aggggaccac  atctacgctg
361  acaatgaatc  ctgtagttt  tgggaacgaa  cactcttacc  tgtgcacagc  aacttgtgaa
421  tctaggaaat  tggaaaaagg  aatccagggt  gagatctact  cttttctaa  ggatccagag
481  attcatttga  gtggcctct  ggaggctggg  aagccgatca  cagtcaagtg  ttcagttgct
541  gatgtatacc  catttgacag  gctggagata  gacttactga  aaggagatca  tctcatgaag
601  agtcaggaat  ttctggagga  tgcagacagg  aagtccttgg  aaaccaagag  tttggaagta
661  acctttactc  ctgtcattga  ggatattgga  aaagttcttg  tttgccgagc  taaattacac
721  attgatgaaa  tggattctgt  gccacagta  aggcaggctg  taaaagaatt  gcaagtctac
781  atatacacca  agaatacagt  tatttctgtg  aatccatoca  caaagctgca  agaaggtggc
841  tctgtgacca  tgacctgttc  cagcgagggt  ctaccagctc  cagagatctt  ctggagtaag
```

```

901 aaattagata atgggaatct acagcacctt tctggaaatg caactctcac cttaattgct
961 atgaggatgg aagattctgg aatttatgtg tgtgaaggag ttaatttgat tgggaaaaac
1021 agaaaagagg tggaaattaat tgttcaaggag aaaccattta ctggtgagat ctcccctgga
1081 ccccgattg ctgctcagat tggagactca gtcattgtga catgtagtgt catgggctgt
1141 gaatccccat ctttctcctg gagaaccag atagacagcc ctctgagcgg gaagggtgag
1201 agtgagggga ccaattccac gctgaccctg agccctgtga gttttgagaa cgaacactct
1261 tatctgtgca cagtgacttg tggacataag aaactggaaa agggaaatcca ggtggagctc
1321 tactcaattcc ctagagatcc agaaatcgag atgagtgggtg gcctcgtgaa tgggagctct
1381 gtcactgtaa gctgcaagg tcttagcgtg taccoccttg accggctgga gattgaatta
1441 cttaaagggg agactattct ggagaatata gagtttttgg aggatacggg tatgaaatct
1501 ctagagaaca aaagtttgga aatgaccttc atccctacca ttgaagatac ttgaaaagct
1561 cttgtttgtc aggctaagtt acatattgat gacatggaat tcgaacccaa acaaaggcag
1621 agtacgcaaa cactttatgt caatggtgcc cccagagata caaccgtctt ggtcagccct
1681 tctccatcc tggaggaagg cagttctgtg aatatgacat gcttgagcca gggctttcct
1741 gctccgaaaa tctgtggag caggcagctc cctaacgggg agctacagcc tctttctgag
1801 aatgcaactc tcaccttaat ttctacaaaa atggaagatt ctgggggttta tttatgtgaa
1861 ggaattaacc aggctggaag aagcagaaag gaagtggaat taattatcca agttactcca
1921 aaagacataa aacttacagc ttttcttct gagagtgtca aagaaggaga cactgtcatc
1981 atctcttgta catgtggaaa tgttccagaa acatggataa tctgaagaa aaaagcggag
2041 acaggagaca cagtactaaa atctatagat ggcgcctata ccatccgaaa ggcccagttg
2101 aaggatgcgg gagtatatga atgtgaatct aaaaacaaag ttggctcaca attaagaagt
2161 ttaacacttg atgttcaagg aagagaaaac aacaaagact atttttctcc tgagcttctc
2221 gtgctctatt ttgcatcctc ctttaataa cctgccattg gaatgataat ttactttgca
2281 agaaaagcca acatgaaggg gtcatatagt ctgtagaag cacagaaatc aaaagtgtag
2341 ctaatgcttg atatgttcaa ctggagacac ttttatctg tgcaaatcct tgatactgct
2401 catcattcct tgagaaaaac aatgagctga gaggcagact tccctgaatg tattgaactt
2461 ggaaagaaat gccatctat gtcccttgct gtgagcaaga agtcaaagta aaacttgctg
2521 cctgaagaac agtaactgcc atcaagatga gagaactgga ggagtctcct gatctgtata
2581 tacaataaca taatttgta atatgtaaaa taaaattatg ccatagcaag attgcttaa
2641 atagcaacac tctatattta gattgttaaa ataactagtg ttgcttgagc tattataatt
2701 taatgcatgt taggaaaatt tcacattaat atttgctgac agctgacctt tgtcatcttt
2761 cttctatttt attccctttc acaaaatttt attcctatat agttttattg caataatttc
2821 aggttttgta aagatgocgg gttttatatt tttatagaca aataataagc aaaggagca
2881 ctgggttgac tttcaggtac taaatacctc aacctatggt ataatggttg actgggtttc
2941 tctgtatagt actggcatgg tacggagatg tttcacaag tttgttcac agactcctgt
3001 gcaactttcc caatgtggcc taaaaatgca acttctttt attttcttt gtaaagtgtt
3061 aggttttttt gtatagtaaa gtgataattt ctggaattag aaaaaaaaa aaaaaaaaa

```

Codón de paro

Organización Estructural de la Proteína

- EXON 1 (sombreado). Comienza en la base nitrogenada 1 hasta la 184 pero la proteína, empieza en la adenina 121 con la codificación de una *metionina*. Se generan un total de 21 aminoácidos
- EXON 2. Comienza en la base nitrogenada 185 y termina en la 460. Empieza con la codificación de una *serina* en la posición 22, generándose un total de 92 aminoácidos

- EXON 3 (sombreado). Comienza en la base nitrogenada 461 y termina en la 781. Empieza con la codificación de una *serina* en la posición 113, generándose un total de 107 aminoácidos
- EXON 4. Comienza en la base nitrogenada 782 y termina en la 1048. Empieza con la codificación de una *isoleucina* en la posición 220, generándose un total de 89 aminoácidos
- EXON 5 (sombreado). Comienza en la base nitrogenada 1049 y termina en la 1324. Empieza con la codificación de un *glutamato* en la posición 309, generándose un total de 92 aminoácidos
- EXON 6. Comienza en la base nitrogenada 1325 y termina en la 1645. Empieza con la codificación de una *serina* en la posición 401, generándose un total de 107 aminoácidos
- EXON 7 (sombreado). Comienza en la base 1646 y termina en la 1912. Empieza con la codificación de una *valina* en la posición 508, generándose un total de 89 aminoácidos
- EXON 8. Comienza en la base nitrogenada 1913 y termina en la 2179. Empieza con la codificación de una *valina* en la posición 516, generándose un total de 89 aminoácidos
- EXON 9 (sombreado). Comienza en la base nitrogenada 2180 y termina en la 2340. Empieza con la codificación de una *glicina* en la posición 605, generándose un total de 54 aminoácidos

TRANSLATION

LOCUS NP_001069 739 aa linear PRI 11-FEB-2008

DEFINITION vascular cell adhesion molecule 1 isoform a precursor

ACCESSION NP_001069

VERSION NP_001069.1 GI:4507875

SOURCE Homo sapiens (human)

ORIGIN

1 mpgkmvvilg asnilwimfa asqafkiett pesrylaqig dsvgltcstt gcespffswr
61 tqidsplngk vtnegttstl tmnpvsfgne hsylctatce srklekqiqv eiysfpkdpe
121 ihlsgpleag kpitvkcsva dvypfdrlei dllkgdhlmk sqefledadr ksletkslev
181 tftpviedig kvlvcraklh idemsvptv r^Gqavkelqvy ispkn^Gtvisv npstklqegg
241 svtmtcsseg lpapeifwsk kldngnlqhl s^Ggnatltlia mrm^Gedsgiyv cegvnligkn
301 rkevelivqe kpftveisp^Gg priaaqigds vmltcsvmgc esp^Gsfswrtq idsplsgkvr
361 segt^Gnstltl spvsfenehs ylctvtcghk klekqiqvel ysfpr^Gdpeie msgglvng^Gss
421 vtvsckvpsv ypldrleiel lkgetileni efledtdmks len^Gkslem^Gtf iptiedtgka
481 lvcqaklhid dmefepkqrq stqtlyvnva prdt^Gtlvsp ssileegssv nmtclsqg^Gfp
541 apkilwsrql pngelqplse n^Gatltlistk medsgvylce ginqagr^Gsrk eveliiqv^Gtp
601 kdikltafps esvkegdtvi isctcgnvpe twiilkkae tgdtvlksid gaytirkaql
661 kdagvyeces knkvgsqlrs ltldvqgren nkdyfspell vlyfasslii paigmiiyfa
721 rkanmkgsys lveaqkskv

G = posiciones de las asparaginas que presentan las N-glicosilaciones reportadas para VCAM-1

ExPASy web site

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

10	20	30	40	50	60
MPGKMVVILG	ASNILWIMFA	ASQAFKIETT	PESRYLAQIG	DSVSLTCSTT	GCESPFFSWR
70	80	90	100	110	120
TQIDSPLNGK	VTNEGTTSTL	TMNPVSFGNE	HSYLCTATCE	SRKLEKGIQV	EIYSFPKDPE
130	140	150	160	170	180
IHLSGPLEAG	KPITVKCSVA	DVYPFDRLEI	DLLKGDHLMK	SQEFLEDADR	KSLETKSLEV
190	200	210	220	230	240
TFTPVIEDIG	KVLVCRAKLH	IDEMSVPTV	RQAVKELQVY	ISPKN ^G TVISV	NPSTKLQEGG
250	260	270	280	290	300
SVTMTCSSEG	LPAPEIFWSK	KLDNGNLQHL	SGNATLTLIA	MRMEDSGIYV	CEGVN ^G LIGKN
310	320	330	340	350	360
RKEVELIVQE	KPFTVEISPG	PRIAAQIGDS	VMLTCSVMGC	ESPSFSWRTQ	IDSPLSGKVR
370	380	390	400	410	420
SEGTNSTLTL	SPVSFENEHS	YLCTVTCGHK	KLEKGIQVEL	YSFPRDPEIE	MSGGLVNGSS

430 440 450 460 470 480
 VTVSCKVPSV YPLDRLEIEL LKGETILENI EFLEDTDMKS LENKSLEMFTF IPTIEDTGKA

 490 500 510 520 530 540
 LVCQAKLHID DMEFEPKQRQ STQTLVNVVA PRDTTVLVSP SSILEEGSSV NMTCLSQGFP

 550 560 570 580 590 600
 APKILWSRQL PNGELQPLSE NATLTLISTK MEDSGVYLCE GINQAGRSRK EVELIIQVTP

 610 620 630 640 650 660
 KDIKLTAFPS ESVKEGDTVI ISCTCGNVPE TWIILKKKAE TGDTVLSID GAYTIRKAQL

 670 680 690 700 710 720
 KDAGVYECES KNKVGSQLRS LTLDVQREN NKDYFSPELL VLYFASLLII PAIGMIIYFA

 730
 RKANMKGSYS LVEAQKSKV

Theoretical pI/Mw: 5.14 / 81276.17

VCAM-1 ISOFORM "B"

LOCUS NM_080682 2843 bp mRNA linear PRI 06-APR-2008

DEFINITION **Homo sapiens vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1), transcript variant 2, mRNA.**

ACCESSION NM_080682

VERSION NM_080682.1 GI:18201908

SOURCE Homo sapiens (human)

Transcript Variant:

This variant (2) lacks exon 5 compared to transcript variant 1. It maintains the same reading frame and encodes the shorter isoform (b), which lacks aa 310-401 of isoform a.

ORIGIN

1 cgcggtatct gcatcggggcc tcaactggctt caggagctga ataccctccc aggcacacac
 61 aggtgggaca caaataaggg ttttgggaacc actatcttct catcacgaca gcaacttaaa
 121 **atg**cctggga agatggtcgt gatccttggg gcctcaaata tactttggat aatgtttgca
 181 gct**tct**caag cttttaaaat cgagaccacc ccagaatcta gatatcttgc tcagattggt
 241 gactccgtct cattgacttg cagcaccaca ggctgtgagt ccccatTTTT ctcttggaga
 301 acccagatag atagtccact gaatgggaag gtgacgaatg aggggaccac atctacgctg
 361 acaatgaatc ctgttagttt tgggaacgaa cactcttacc tgtgcacagc aacttgtgaa
 421 tctaggaat tggaaaaagg aatccagggt gagatctact **ct**tttctaa ggatccagag
 481 attcatttga gtggcctct ggaggctggg aagccgatca cagtcaagtg ttcagttgct
 541 gatgtatacc cattedgacag gctggagata gacttactga aaggagatca tctcatgaag
 601 agtcaggaat ttctggagga tgcagacagg aagtcctgg aaaccaagag tttggaagta
 661 acctttactc ctgtcattga ggatattgga aaagtcttgg tttgccgagc taaattacac
 721 attgatgaaa tggattctgt gccacagta aggcaggctg taaaagaatt gcaagtctac
 781 **ata**tcacca agaatacagt tatttctgtg aatccatcca caaagctgca agaaggtggc
 841 tctgtgacca tgacctgttc cagcgagggt ctaccagctc cagagatttt ctggagtaag
 901 aaattagata atgggaatct acagcacctt tctggaaatg caactctcac cttaattgct
 961 atgaggatgg aagattctgg aatttatgtg tgtgaaggag ttaatttgat tgggaaaaac
 1021 agaaaagagg tggaaattaat tgttcaagca ttcctag**ag** atccagaaat cgagatgagt
 1081 ggtggcctcg tgaatgggag ctctgtcact gtaagctgca aggttcttag cgtgtacccc
 1141 cttgaccggc tggagattga attacttaag ggggagacta ttctggagaa tatagagttt
 1201 ttggaggata cggatatgaa atctctagag aacaaaagtt tggaaatgac cttcatcct
 1261 accattgaag atactggaaa agctcttgtt tgtcaggcta agttacatat tgatgacatg
 1321 gaattcgaac ccaaacaaag gcagagtaag caaacacttt atgtcaat**gt** tggccccaga
 1381 gatacaaccg tcttggtcag cccttctctc atcctggagg aaggcagttc tgtgaatatg
 1441 acatgcttga gccagggctt tctgtctcgg aaaatcctgt ggagcaggca gctccctaac
 1501 ggggagctac agctctttc tgagaatgca actctcact taatttctac aaaaatggaa
 1561 gaatttgggg tttatttatg tgaaggaatt aaccaggctg gaagaagcag aaaggaagtg
 1621 gaattaatta tcca**gtt**ac tccaaaagac ataaaactta cagcttttcc ttctgagagt
 1681 gtcaaagaag gagacactgt catcatctct tgtacatgtg gaaatgttcc agaaacatgg
 1741 ataatcctga agaaaaaagc ggagacagga gacacagtac taaaatctat agatggcgcc
 1801 tataccatcc gaaaggccca gttgaaggat gcgggagtat atgaatgtga atctaaaaac
 1861 aaagttggct cacaaatgaag aagtttaaca cttgatgttc aa**gga**agaga aaacaacaaa
 1921 gactatTTTT ctctgagct tctcgtgctc tattttgcat cctccttaat aatacctgcc
 1981 attggaatga taatttactt tgcaagaaaa gccaacatga aggggtcata tagtcttgta
 2041 gaagcacaga aatcaaaagt **gtag**ctaatg cttgatatgt tcaactggag acaactatta
 2101 tctgtgcaaa tccttgatac tgctcatcat tccttgagaa aaacaatgag ctgagaggca
 2161 gacttccctg aatgtattga acttggaaag aaatgcccat ctatgtccct tgcgtgtagc
 2221 aagaagtcaa agtaaaactt gctgcctgaa gaacagtaac tgccatcaag atgagagAAC
 2281 tggaggagtt ccttgatctg tatatacaat aacataattt gtacatatgt aaaataaaat
 2341 tatgccatag caagattgct taaaatagca acaactctata tttagattgt taaaataact
 2401 agtgttgctt ggactattat aatttaatgc atgttaggaa aatttcacat taatatttgc
 2461 tgacagctga cctttgtcat ctttcttcta ttttattccc tttcacaaaa ttttattcct
 2521 atatagttta ttgacaataa tttcaggttt tgtaaagatg ccgggtttta ttttttata
 2581 gacaaataat aagcaaaggg agcactgggt tgactttcag gtactaaata cctcaacctA
 2641 tggataatg gttgactggg tttctctgta tagtactggc atggtacgga gatgtttcac
 2701 gaagtttgtt catcagactc ctgtgcaact ttccaatgt ggcctaaaaa tgcaacttct
 2761 ttttattttc ttttgaat gtttaggttt ttttgtatag taaagtgata atttctggaa
 2821 ttagaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

Organización Estructural de la Proteína

- EXON 1 (sombreado). La proteína comienza con la codificación de una *metionina* a partir de la base nitrogenada 121, generándose un total de 21 aminoácidos
- EXON 2. Comienza en la base nitrogenada 184 y termina en la 460. Empieza con la codificación de una *serina* en la posición 22, generándose un total de 92 aminoácidos
- EXON 3 (sombreado). Comienza en la base nitrogenada 461 y termina en la 781. Empieza con la codificación de una *serina* en la posición 113, generándose un total de 107 aminoácidos
- EXON 4. Comienza en la base nitrogenada 782 y termina en la 1048. Empieza con la codificación de una *isoleucina* en la posición 220 generándose un total de 89 aminoácidos
- EXON 5 (sombreado). Comienza en la base nitrogenada 1049 y termina en la 1369. Empieza con la codificación de un *glutamato* en la posición 309 generándose un total de 92 aminoácidos
- EXON 6. Comienza en la base nitrogenada 1370 y termina en la 1636. Empieza con la codificación de una *valina* en la posición 508, generándose un total de 89 aminoácidos
- EXON 7 (sombreado). Comienza en la base nitrogenada 1637 y termina en la 1903. Empieza con la codificación de una *valina* en la posición 516, generándose un total de 89 aminoácidos
- EXON 8. Comienza en la base nitrogenada 1904 y termina en la 2826. Empieza con la codificación de una *glicina* en la posición 605, generándose un total de 54 aminoácidos

TRANSLATION

LOCUS NP_542413 647 aa linear PRI 10-FEB-2008

DEFINITION vascular cell adhesion molecule 1 isoform b precursor

ACCESSION NP_542413

VERSION NP_542413.1 GI:18201909

SOURCE Homo sapiens (human)

ORIGIN

1 mpgkmvvilg asnilwimfa asqafkiett pesrylaqig dsvsltcstt gcespffswr
61 tqidsplngk vtnegttstl tmnpvsfgne hsylctatce srklekgiqv eiysfpkdpe
121 ihlsgpleag kpitvkcsva dvypfdrlei dllkgdhlmk sqefledadr ksletkslev
181 tftpviedig kvlvcraklh idemsvptv rqavkelqvy ispknvisv npstklqegg
241 svtmtcsseg lpapeifwsk kldngnlqhl sgnatltlia mrmmedsgiyv cegvnligkn
301 rkevelivqa fprdpeiems gglvngssvt vsckvpsvyp ldrleiellk getilenief
361 ledtdmksle nkslemtfip tiedtgkalv cqaklhiddm efepkqrqst qtlyvnavpr
421 dttvlvspss ileegssvnm tclsqgfpap kilwsrqlpn gelqplsenatltlistkme
481 dsgvylcegi nqagrskrkev eliiqvtpkd ikltafpses vkegdtviis ctcgnvpew
541 iilkkaetg dtvlksidga ytirkaqlkd agvyeceskn kvgsqrlsrlt ldvqgrennk
601 dyfspellvl yfassliipa igmiiyfark anmkgsyslv eaqkskv

G = posiciones de las asparaginas que presentan las N-glicosilaciones reportadas para VCAM-1

ExPASy web site

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

10 20 30 40 50 60
MPGKMVVILG ASNILWIMFA ASQAFKIETT PESRYLAQIG DSVSLTCSTT GCESPPFFSWR

70 80 90 100 110 120
TQIDSPLNGK VTNEGTTSTL TMNPVSGFNE HSYLCTATCE SRKLEKGIQV EIYSFPKDPE

130 140 150 160 170 180
IHLSGPLEAG KPITVKCSVA DVYFPDRLEI DLLKGDHLMK SQEFLEDADR KSLETKSLEV

190 200 210 220 230 240
TFTPVIEDIG KVLVCRAKLH IDEMDSVPTV RQAVKELQVY ISPKNTVISV NPSTKLQEGG

250 260 270 280 290 300
SVTMTCSSEG LPAPEIFWSK KLDNGNLQHL SGNATLTLIA MRMEDSGIYV CEGVNLIGKN

310 320 330 340 350 360
RKEVELIVQA FPRDPEIEMS GGLVNGSSVT VSCKVPSVYP LDRLEIELLK GETILENIEF

370 380 390 400 410 420
LEDTDMKSLE NKSLEMTFIP TIEDTGKALV CQAKLHIDDM EFEPKQRQST QTLYVNVAPR

430 440 450 460 470 480
DTTVLVSPSS ILEEGSSVNM TCLSQGFPAP KILWSRQLPN GELQPLSENA TLTLISTKME

490 500 510 520 530 540
DSGVYLCEGI NQAGRSRKEV ELIIQVTPKD IKLTAFPSES VKEGDTVIIIS CTCGNVPETW

550 560 570 580 590 600
IILKKAETG DTVLKSIDGA YTIRKAQLKD AGVYECESKN KVGSQLRSLT LDVQGRENNK

610 620 630 640
DYFSPELLVL YFASSLIIPA IGMIIYFARK ANMKGSYSLV EAQKSKV

Theoretical pI/Mw: 5.09 / 71254.80

Research article

Open Access

Glycosylated VCAM-I isoforms revealed in 2D western blots of HUVECs treated with tumoral soluble factors of breast cancer cells

Delina Montes-Sánchez^{1,2,3}, Jose Luis Ventura^{1,2}, Irma Mitre^{1,2}, Susana Frías^{1,2}, Layla Michán^{1,2}, Aurora Espejel-Nuñez⁴, Felipe Vadillo-Ortega⁵ and Alejandro Zentella*^{1,2}

Address: ¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Ciudad Universitaria, Circuito Interior apartado postal 70228, CP04510, México DF, ²Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", SSA Vasco de Quiroga no 15 Colonia Sección XVI, Delegación Tlalpan. CP.4080, México DF, ³Dirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, SSA Av San Fernando no 22 Col. Sección XVI, Tlalpan, CP 14080, México DF, ⁴Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Perinatología, SSA Montes Urales 800 Torre de Investigación 5° piso, Colonia Lomas Virreyes, Delegación Miguel Hidalgo, CP11000, México DF and ⁵Edificio de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad Universitaria, Circuito Interior apartado postal 70228, CP04510, México DF

Email: Delina Montes-Sánchez - dely.ms@gmail.com; Jose Luis Ventura - venturag@biomedicas.unam.mx; Irma Mitre - irmamitre@yahoo.com; Susana Frías - mssfrías@gmail.com; Layla Michán - laylamichan@yahoo.com; Aurora Espejel-Nuñez - aurora_espnu@yahoo.com.mx; Felipe Vadillo-Ortega - felipe.vadillo@gmail.com; Alejandro Zentella* - azentell@biomedicas.unam.mx

* Corresponding author

Published: 22 November 2009

Received: 8 June 2009

BMC Chemical Biology 2009, 9:7 doi:10.1186/1472-6769-9-7

Accepted: 22 November 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6769/9/7>

© 2009 Montes-Sánchez et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Several common aspects of endothelial phenotype, such as the expression of cell adhesion molecules, are shared between metastasis and inflammation. Here, we analyzed VCAM-I variants as biological markers of these two types of endothelial cell activation. With the combination of 2-DE and western blot techniques and the aid of tunicamycin, we analyzed N-glycosylation variants of VCAM-I in primary human endothelial cells stimulated with either TNF or tumoral soluble factors (TSF's) derived from the human breast cancer cell line ZR75.30.

Results: Treatments induced a pro-adhesive endothelial phenotype. 2D western blots analysis of cells subjected to both treatments revealed the expression of the two known VCAM-I isoforms and of previously unknown isoforms. In particular TSFZR75.30 induced an isoform with a relative molecular mass (Mr) and isoelectric point (pI) of 75-77 kDa and 5.0, respectively.

Conclusion: The unknown isoforms of VCAM-I that were found to be overexpressed after treatment with TSF's compared with TNF, could serve as biomarkers to discriminate between inflammation and metastasis. 2D western blots revealed three new VCAM-I isoforms expressed in primary human endothelial cells in response to TSF stimulation. Each of these isoforms varies in Mr and pI and could be the result of differential glycosylation states.

Background

Endothelial cells line the inside of all blood vessels forming an interface between circulating blood and the underlying tissues. As such, endothelial cells comprise, a critical metabolic organ involved in the generation and regulation of multiple physiological and pathological processes such as coagulation, hemostasis of local vascular pressure, inflammation, atherosclerosis, angiogenesis, and metastasis [1]. In the context of the current model of tumoral dissemination, glycoproteins including cell adhesion molecules are expressed on the apical endothelial membrane, interacting with counter-receptors on circulating cancer cells, facilitating the spread of the disease [2,3].

Glycoproteins are prominent constituents of biological membranes, and are involved in various biological functions, including immunological protection, enzymatic catalysis, hormonal control, ion transport, structural support, molecular recognition, and cell adhesion. Structurally, glycoproteins are comprised of a peptide backbone, with carbohydrate chains covalently attached to asparagine (N-glycan) or serine/threonine (O-glycan) residues [4,5]. The immunoglobulin super family of cell adhesion molecules (IgCAMs) constitutes a large group of cell surface glycoproteins that are specialized for cell-cell adhesion [6,7]. Recently, these molecules have been reported to play an important role in pathological processes, including tumor invasion and metastasis [8,9]. In particular, vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) is a cell surface glycoprotein expressed on the apical membrane of endothelial cells activated by cytokines [10,11]. Two isoforms of VCAM-1 have been reported, a full length protein (a) and a smaller version (b) lacking exon 5. Their expression occurs in response to inflammatory mediators and is dependent on the translocation of the transcription factor NF- κ B into the nucleus [12]. VCAM-1 interacts with its integrin counter receptor very late antigen-4 (VLA-4), to mediate the recruitment of leukocytes [13-15]. The adhesion of tumor cells to the apical endothelial membrane resembles their interaction with leukocytes when endothelial cells have been activated with tumor necrosis factor (TNF). TNF is a pro-inflammatory cytokine, principally derived from mononuclear phagocytes, that induces transient phenotypic changes in the endothelial cells, transforming their apical membrane from a quiescent non-adhesive to an activated pro-adhesive surface amenable for cell-cell interactions [16-18].

We have previously reported that the tumoral soluble factors (TSF's) with a very low to none TNF content can induce a strong pro-adhesive phenotype similar to the one induced by TNF [19-21]. Here we analyzed changes in the content of VCAM-1 in endothelial cells under experimental treatments with TNF or TSF's that led to an increase in

tumor cell adhesion. We combined enhanced chemiluminescent sensitive (ECL) detection with the high resolving power of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE), using these techniques and the aid of tunicamycin were able to identify undescribed isoforms of VCAM-1.

Results

Tumoral soluble factors (TSF's) secreted by human breast cancer cell lines induced adhesion of U937 myeloma cells to HUVECs

Using an *in vitro* cell adhesion assay, we found that tumor soluble factors (TSF's) induced an activated phenotype of HUVECs (Figure 1). The cells were stimulated for 3 h with either TNF (10 ng/ml) or TSF's derived from breast cancer cell lines: MCF-7 and ZR75.30 (1 μ g/ml), (labeled TSFMCF-7 and TSFZR75.30, respectively), diluted in M-199 medium. Then, the medium containing TNF or TSF's was removed, and the HUVECs were coincubated for 3 more h with previously radio-labeled U937 cells as was described in methods. Compared to untreated control cells, HUVECs treated with TNF presented a 2.6 fold increase in cell adhesion, while those treated with TSFZR75.30 had a 1.5 induction. The soluble factors secreted by the other breast cancer cell line (TSFMCF-7) did not show any adhesive effects. These results indicate that TSFZR75.30 induced a pro-adhesive phenotype similar to that induced by TNF.

Biochemical contents of TSFZR75.30

We used a Bio-Plex system™ by BIO-RAD, CA. [16,22] to evaluate the content of cytokines, chemokines, and growth factors in TSFZR75.30. The results are summarized in Table 1. TSFZR75.30 contained four cytokines (IL-6, IL-8, G-CSF, MCP-1) that were present at levels above the maximum measured limit. Nine cytokines (IL-2, IL-4, IL-10, IL-5, IL-7, IL-9, IP-10, MIP-1 α , RANTES) were below the minimum measurable limit, and thirteen were present at low levels within the detectable range, TNF was present in this group. In comparison with the amount used (10 ng/ml), TNF was 50 times less abundant (0.22 ng/ml) in the mixture of TSFZR75.30. Taken together, these results suggest that TSFZR75.30 contain cytokines, chemokines, and growth factors that are able to induce a proadhesive phenotype in endothelial cells.

TSFZR75.30 induced the expression of VCAM-1 isoforms in HUVECs that disappeared when the cells were pre-treated with tunicamycin

VCAM-1 is a classic cell adhesion molecule, with a Mr ~80-110, that is expressed during the inflammatory response and has also been associated with tumoral dissemination [23-25]. VCAM-1 is a surface molecule reported to have two isoforms: i) the complete form (a),

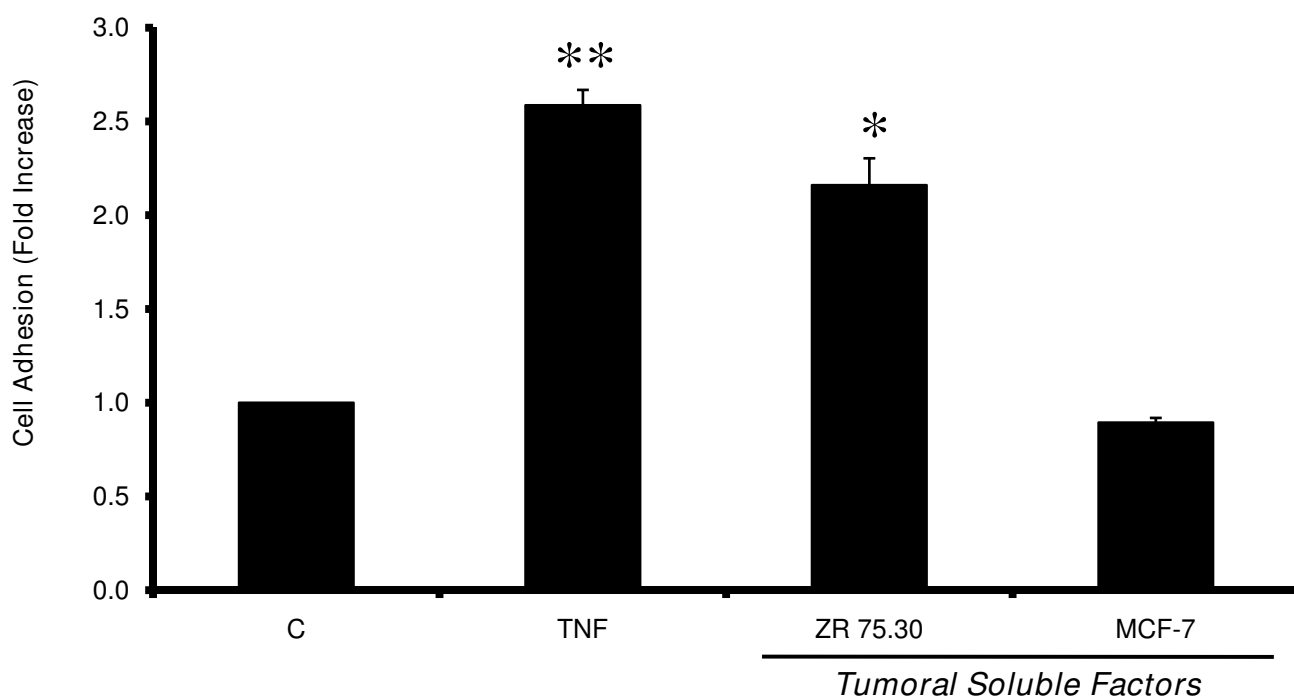


Figure 1
Tumoral soluble factors derived from breast cancer cell line ZR75.30 increase adhesion. The cell adhesion assay shows the endothelial activation, which is proportional to the adhesion of human myeloma U937 cells to HUVECs. Each bar represents the average of three independent experiments performed in triplicates. Statistical significance when compared to the control group is defined as: $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**). The error bars indicate \pm standard error of the mean.

composed of 739 amino acid residues encoded by nine exons and containing six N-glycosylation sites that are indispensable for protein function during molecular recognition with integrins, and ii) the small form (b), which is composed of 647 residues and results from an alternative splicing event that removes exon 5, eliminating the second N-glycosylation site (Figure 2A). The changes in the cellular content of VCAM-1 were evaluated by western blots analysis from total extracts of HUVECs treated with either TNF or TSFZR75.30 for 6 h (Figure 2B). The content of VCAM-1 in cells treated with TNF (10 ng/ml) and TSFZR75.30 (1 μ g/ml) was increased. The two reported isoforms appeared as a tight doublet (VCAM-1a, Mr \sim 90-95 kDa and VCAM-1b \sim 80-83 kDa) (lanes 3 and 5). Compared to the control, VCAM-1a isoform increased 41 and 60 fold, while isoform VCAM1b increased 10 and 15 fold. However, when we pre-treated cells for 3 h with tunicamycin (1 μ g/ml), an inhibitor of N-glycosylation, only the band corresponding to isoform "a" was visible in TNF-treated HUVECs (lane 4). In the case of treatment with the TSFZR75.30, a new isoform was revealed, with a Mr \sim 77 kDa, in addition to isoform "a" (lane 6). In both cases isoform "b" was absent. Expression of isoform "a" and the new isoform, labeled as "x", was increased 17 and 15 fold

respectively, to the control. It is clear that tunicamycin had a differential effect on the glycosylation state and the content level of VCAM-1 isoforms, leading to the disappearance of isoform "b" and the emergence of a undescribed VCAM-1 isoform in cells treated with TSFZR75.30, labeled here as isoform "x". When we performed a cell adhesion assay similar to the one describe in Figure 1, on cell that had been pretreated with tunicamycin (1 μ g/ml) for 3 h. The fold increase in cell adhesion induced by TSFZR75.30 fell from 3.1 ± 0.5 to 1.7 ± 0.3 in control HUVECs compared to cells pretreated with tunicamycin. These results indicate that 50% of the observed cell adhesion is dependent from N-glycosylations.

2-DE analysis of total extracts of HUVECs treated with TNF or TSFZR75.30

In an attempt to further characterize the different VCAM-1 isoforms visualized in Figure 2B, we prepared 2-DE gels that were stained with a fluorescent dye (Deep purple™) and analyzed, focusing on the regions expected to contain these isoforms. Two dimensional electrophoresis of total extracts from HUVECs treated with TNF presented 191 spots, 24% more than control cells (154 spots) or those treated with TSFZR75.30 (150 spots) (Figure 3, upper

Table 1: Elements contained (pg/ml) in TSFZR75.30 examined by Bio-Plex array.

	TSFZR75.30	Maximum detected	Minimum detected
IL-2	<1.3	21517	1.3
IL-4	<0.2	3854	0.2
IL-6	>33053	33053	2.0
IL-8	>24800	24800	1.5
IL-10	<1.9	30108	1.9
GM-CSF	354	10791	0.6
IFN γ	112.5	40543	2.5
TNF	22.5	70463	4.3
IL-1 β	49.9	37082	2.3
IL-5	<2.4	39452	2.4
IL-7	<2.7	44339	2.7
IL-12	12.5	41843	2.5
IL-13	29.5	33114	2.0
IL-17	13	26740	1.6
G-CSF	>28728	28728	1.7
MCP-1	>27978	27978	1.7
MIP-1 β	15.5	37041	2.2
IL-1 α	130.5	42658	2.6
IL-9	<1.6	27064	1.6
IL-15	13	26368	1.6
Eotaxin	8.5	24294	1.5
FGF-basic	9	18355	1.1
IP-10	<4.3	69784	4.3
MIP-1 α	<1.1	18493	1.1
PDGF-BB	14.5	32062	1.9
RANTES	<1.5	24678	1.5
VEGF	11590.5	39592	2.4

panels). The dotted rectangles correspond to the position (Mr and pI) predicted for the VCAM-1 isoforms. An amplified view of this region appears in the lower panels; 16 spots were detected with variations in intensity between treatments. However, none of the spots replicated the increase in the amounts of VCAM-1 isoforms observed in the westerns blots from Figure 2B. It is possible that the amount of protein on the gels was not enough to visualize the VCAM-1 isoforms.

Proteic isoforms of VCAM-1 can be observed in 2D westerns of HUVECs treated with TNF or TSFZR75.30

Considering that the resolution of the 2-DE gels was adequate and that the western blots analysis of VCAM-1 expression yielded intense signals, we combined these two approaches and performed 2D western blots that revealed an unexpected variety of VCAM-1 isoforms (Figure 4). We identified the only barely visible spot in the untreated control cells that displayed Mr/pI values close to those reported for the full length as the VCAM-1 isoform "a" (Mr ~90-95 kDa/pI 4.8) (Figure 4C, left panels). The expression of this isoform was significantly increased when cells were treated with TNF or with TSFZR75.30. With TNF (T) two isoforms, labeled as "b" (Mr ~80 kDa/pI 4.6) and "c" (Mr ~83 kDa/pI 5.1-5.2), appeared below isoform "a". With TSFZR75.30 (ZR), three spots were vis-

ible: two corresponded with spots "b" and "c" and a third additional isoform labeled as "d" (Mr ~77 kDa/pI 5.0) also became apparent.

Following the same strategy used in Figure 2 to reveal isoforms with different N-glycosylation states, we resolved using 2D westerns blots, total extracts from HUVECs pre-treated with tunicamycin. Figure 4C, right panels indicate that the faint spot we previously identified as isoform "a" in the untreated control cells disappeared after tunicamycin treatment. HUVECs treated with TNF (Figure 4T, right panels), showed a spot with the same Mr as isoform "a", but with a shift in isoelectric point from 4.8 to 5.3-5.4, along with a fifth isoform (labelled as "e") that appeared as a faint spot (Mr ~77 kDa/pI 6.0). These isoforms (a and e) were also visible in cells treated with TSFZR75.30 (Figure 4ZR right panels). The isoform "e" was the most basic spot detected and had the same apparent Mr as isoform "d" (Table 2). Interestingly, VCAM-1 isoform "x" seen in Figure 2B displayed a similar Mr (75 kDa) as isoforms "d" and "e" (77 kDa) shown in Figure 4. Thus, in addition to the isoforms "a" and "b" previously reported in the literature, resulting from alternative splicing events, our 2D western blots analysis revealed three new isoforms defined by differential states of N-glycosylation.

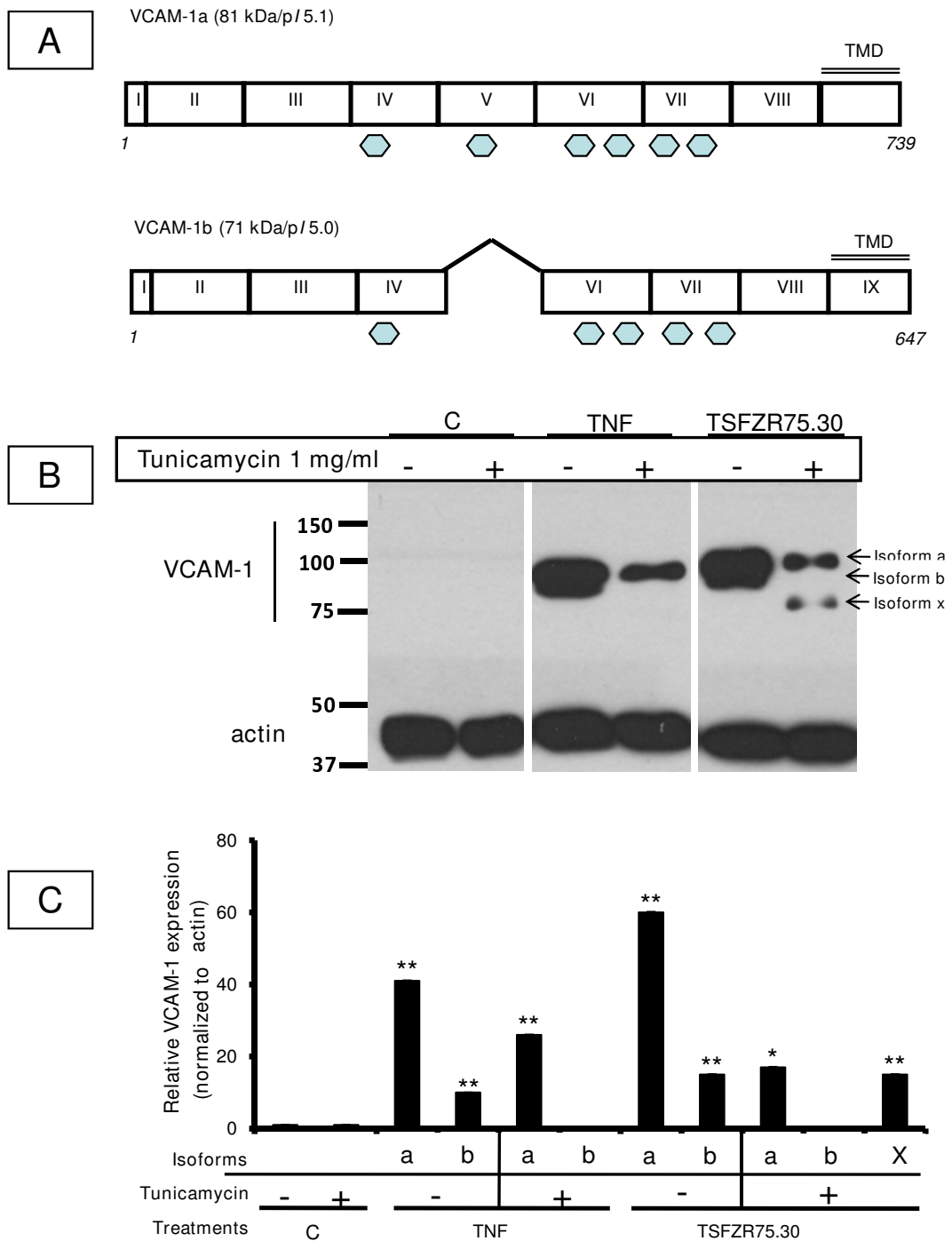


Figure 2
Expression of VCAM-1 cell content is increased when HUVECs are treated with TSFZR75.30 and decreased when cells are pre-treated with tunicamycin. A) Exon maps of VCAM-1a: 739 amino acid, 9 exons and 6 N-glycosylation sites and, VCAM-1b: 647 residues, lacking exon 5 and the 2nd N-glycosylation site (hexagons). B) Western blot to detect VCAM-1 in twenty micrograms of total extracts from HUVECs treated for 3 hr with TNF or TSFZR75.30 (lanes 3,5) or pre-treated with tunicamycin 3 h before TNF or TSF's (lanes 4,6). C) Histogram of the mean of three individual experiments and the normalized densitometric values reflecting expression of the VCAM-1 isoforms: a, b and x with respect to actin signal. $p < 0.001$ (*) compared control. The error bars indicate \pm standard error of the mean.

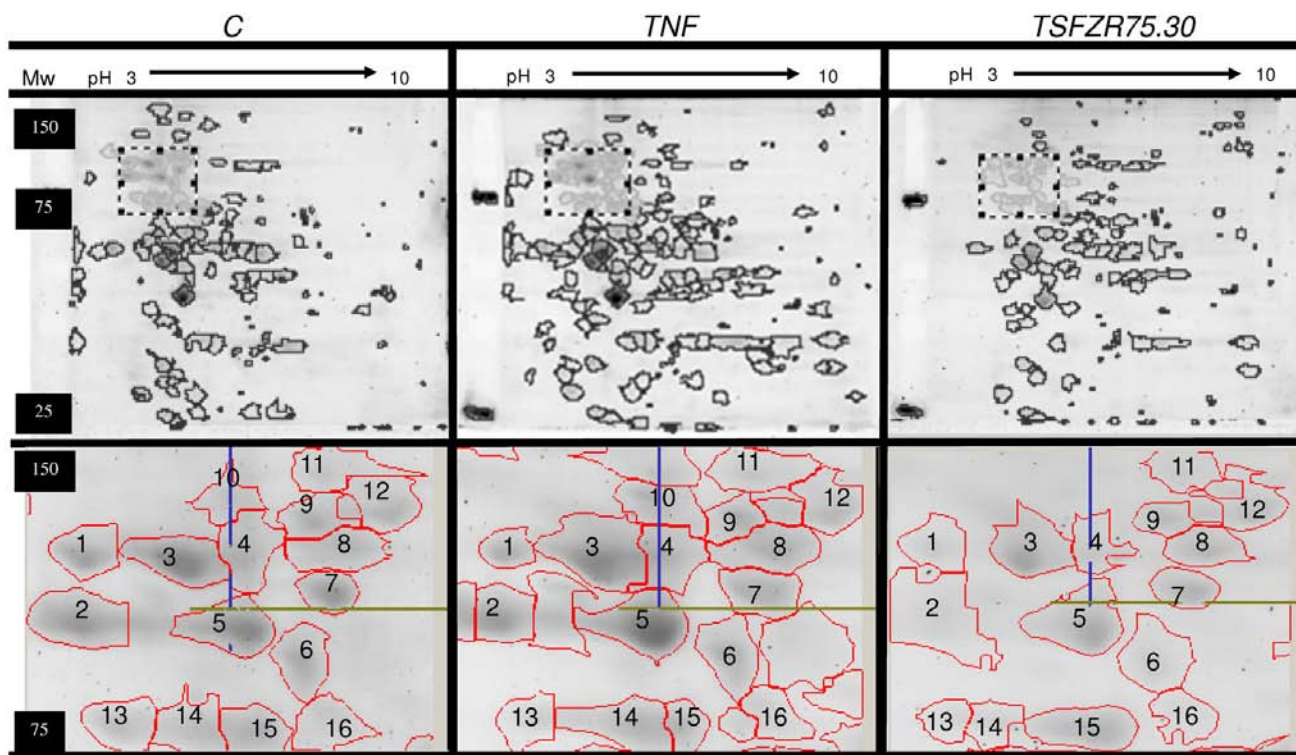


Figure 3

Informatic analyses with the program Image Master 2D Platinum™. 50 µg of total extracts were loaded and stained with the Deep-Purple fluorochrome™. The 1st dimension was resolved in a linear pH-range from 3-10 and in 10% acrylamide for the 2nd dimension. Control (C): left panels; TNF: central panels; TSFZR75.30: right panels. Lower panels represent an amplified view of the dotted rectangle in the upper panels. Patterns are the representative images of three individual experiments each performed in duplicate.

Translocation of NF-κB to the nucleus in HUVECs treated with TSFZR75.30

Since VCAM-1 expression in response to TNF has been reported to be dependent on NF-κB activation, we tested by EMSA whether TSFZR75.30 could elicit a similar translocation of active NF-κB to the nucleus in HUVECs treated with these tumoral factors. Several DNA/NF-κB complexes were visible, but only complex III increased in cells treated with TNF or TSFZR75.30 (Figure 5). While TNF treatment led to a 4-fold increase with respect to control cells, TSFZR75.30 led to only a 2-fold increase (lane 4), despite the fact that this same treatment induces a strong pro-adhesive phenotype (Figure 1). As a negative control, we treated HUVECs with TSMCF-7 and, as was expected, TSMCF-7 did not promote translocation of NF-κB. In fact, a slight decrease in the signal was observed (lane 3). Hence, TSFZR75.30 was able to activate and translocate NF-κB to the nucleus.

Discussion

The interactions of tumor cells with their neighboring endothelial cells present in their surrounding environ-

ment has emerged as an increasingly relevant factor in tumor progression during angiogenesis, intravasation at the primary tumor site, and adhesion and extravasation at the site of metastasis [26-28]. The available information indicates that the soluble factors secreted by tumor cells can alter the phenotype of different cell types, modifying their activity and provoking tissue destruction, tumoral cell migration and dissemination [29]. We have previously reported that HUVECs treated with soluble factors secreted by tumoral cells (TSF's), can adhere U937 cells and that this response is linked to the activation of NF-κB and the expression of cell adhesion molecules [19,30].

Since Jaffe established the methodology for the culture in 1973, HUVECs had been the principal model to the studies of physiological and pathological process involved endothelial cells. For instance, previous studies have investigated functional differences between HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) and HDMECs (human dermal microvascular endothelial cells) with respect to, upregulation of adhesion molecules in response to cytokines, stimulation and expression of sur-

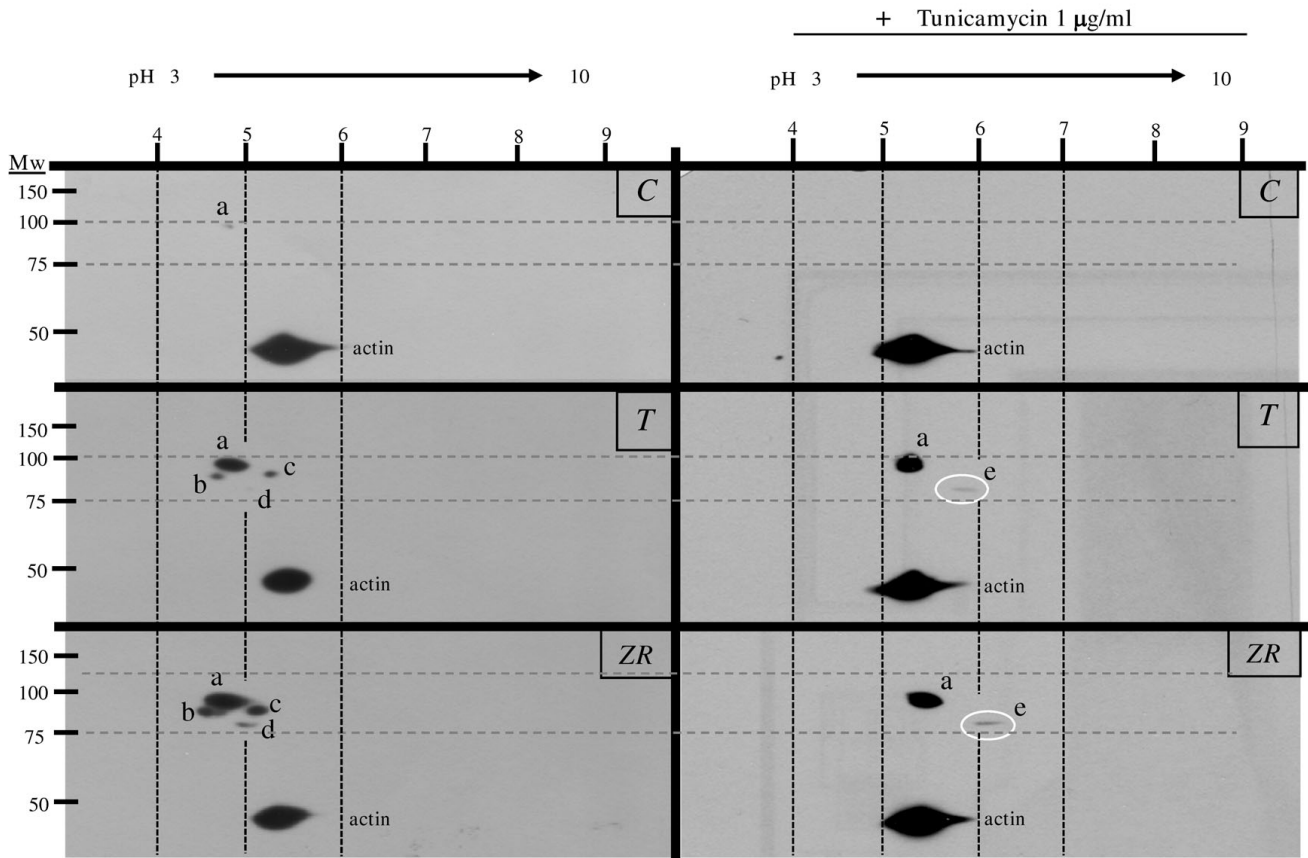


Figure 4

VCAM-I isoforms are observable in 2D western blots. 50 µg of total protein from HUVECs was resolved in the 1st dimension in a linear pH-range from 3-10 and in 10% acrylamide in the 2nd dimension. *Left panels:* VCAM-I isoforms expression in control and treated HUVEC's. *Right panels:* VCAM-I isoforms expression observed in HUVECs with pre-treatment of tunicamycin. Control (C), TNF (T), TSFZR75.30 (ZR). The spot of actin was identified through a specific monoclonal antibody incubated at the same time as the VCAM-I antibody. Molecular weight markers are indicated to the left of the panels and pH gradient markers are indicated above. The dotted grids were added to facilitate the comparison between images. Patterns are the representative images of two individual experiments each performed in duplicate. Numbers in parenthesis after the spot of the VCAM-I isoform "a", reflect the relative amount with respect to samples without tunicamycin, each spot was normalized with the actin signal in the same gel, $p < 0.05$ (*); $n = 3$.

Table 2: Molecular weights and isoelectric points of VCAM-I isoforms.

Isoform	Mr/pI NCBI	Mr/pI treatments	Mr/pI tunicamycin + treatments
a	81 kDa/5.1	90-95 kDa/4.8	90-100 kDa/5.3-5.4
b	71 kDa/5.0	80 kDa/4.6	not observable
c	not reported	83 kDa/5.1-5.2	not observable
d	not reported	77 kDa/5.0	not observable
e	not reported	not observable	77 kDa/5.9-6.1
actin	42 kDa/5.3	42 kDa/5.3	42 kDa/5.3

Comparison between the values reported in the NCBI and the values observed by the treatments in the westerns of this study.

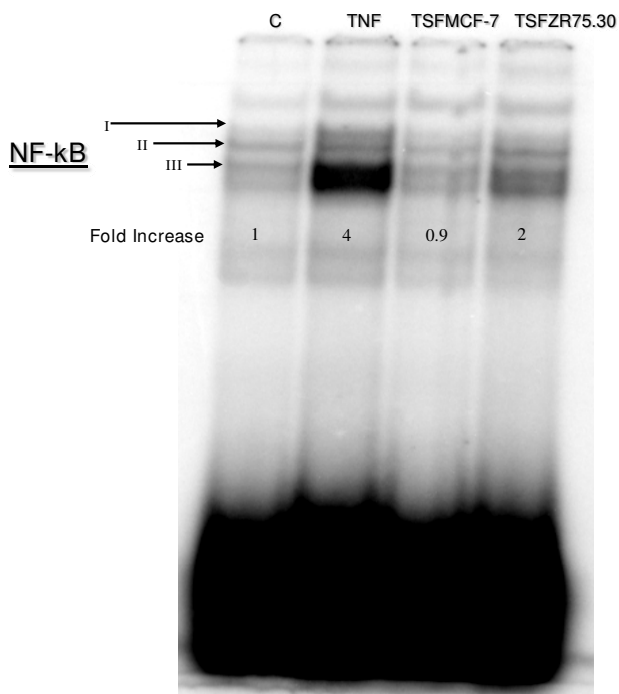


Figure 5
EMSA assay of the NF-κB translocation to the nucleus in HUVECs treated with TSFZR75.30.

Nuclear extracts from HUVECs untreated and treated with TNF, TSMCF-7 or TSFZR75.30, were subjected to EMSA using a probe for NF-κB. Roman numerals indicate NFκB/DNA complexes. Numbers below the complexes correspond to relative intensity of complex III normalized against the control signal, are the mean of two individual experiments with independent cell cultures.

face antigens or mechanical properties of leukocytes rolling. However, at the moment does not exist clear functional differences. Histological studies of the expression of adhesion molecules, as such as VCAM-1 in primary vascular tumoral tissue, can serve to compare endothelial models with the behavior of cells *in vivo* [31-33].

Our current working hypothesis is that the tumor cells can use adhesion molecules, such as VCAM-1, to interact with and adhere to the endothelial monolayers, essentially emulating leukocytes during the inflammatory reaction. In this work, we compared the increase in adhesive capacity of HUVEC's with the increased expression of different VCAM-1 isoforms.

A cell adhesion assay (Figure 1) was used to compare the pro-adhesive phenotype of HUVECs induced by TSF's. Since different tumor cell lines present variable adhesion to unstimulated endothelial cells, we used the promyelo-

cytic human cell line U937 as a probe of the induction of pro-adhesive phenotype in response to the different TSF's. This assay showed that the factors derived from the cell line ZR75.30 (TSFZR75.30) were as effective as TNF in activating the endothelial phenotype, using the concentration of TSF's in which the percentage of adhesion (1 μg/ml-50%), was the highest and did not have differences statistically significatives, with respect to another concentrations (0.5 μg/ml-38%, 0.25 μg/ml-24%, 0.125 μg/ml-19%, 0.0625 μg/ml-18%). TSF's by other three breast cancer cell lines were prepared and tested in the same cell adhesion assay (T47D, MDA MB 435 and MDA MB 231). Addition of 1 μg/ml of TSF's from either induced different fold increase of adhesion: 1.3 ± 0 , 1.6 ± 0.2 , 2.2 ± 0.1 respectively.

TNF is recognized as the most important physiological stimulus for the activation of signaling pathways that lead to the translocation of NF-κB into the nucleus, for several cell types [34-36]. In HUVECs, TNF and TSFZR75.30 both induced the translocation of NF-κB to the nucleus, although the TSF's only stimulated the system by about 50% in comparison with TNF (Figure 5). However, the amount of VCAM-1 expressed was slightly higher in TSFZR75.30 treated cells, suggesting that expression of this adhesion molecule could result from the recruitment of other transcription factors activated by the mixture of elements present in the TSF's. The analysis of the mixture of TSFZR75.30 revealed very low levels of TNF, along with an abundance of cytokines such as IL-6 and IL-8 that could be responsible for NF-κB activation.

The expression of adhesion molecules, such as VCAM-1, in response to chemokines and cytokines is essential in the acute inflammatory response and represents a clear sign of an activated endothelial phenotype [35,37-39]. Unidimensional and bidimensional western blots analysis [40,41] revealed that TSFZR75.30 was able to induce the expression of VCAM-1a (Mr 81 kDa/pI 5.1) [NCBI access number NP_001069] and VCAM-1b (Mr 71 kDa/pI 5.0) [NCBI access number NP_542413] in HUVECs in a similar magnitude as TNF (Figure 2A).

In addition, the westerns showed four new isoforms: isoform x in uni-dimensional gels (Figure 2B) and isoforms c, d, and e in bi-dimensional gels (Figure 4). Isoforms c, d and e were present both, in cells treated with TNF as well as in those treated with TSFZR75.30, although isoform d was barely visible in cells treated with TNF. We conclude that TSFZR75.30 promote a stronger expression of all isoforms compared to the induction mediated by TNF. In an attempt to determine if the isoforms contained N-glycosylations, we interfered with the formation of dolicholpyrophosphate N-acetylglucosamine, the first step in the synthesis of N-linked glycoproteins, by using tunicamy-

cin. Under this condition, the protein portion of glycoproteins will be synthesized completely devoid of N-glycosylations [42]. VCAM-1a has six N-glycosylation sites, whereas removal of exon 5 in VCAM-1b eliminates the second of these sites. Proteins lacking N-glycosylation have been reported to have decreased stability in the endoplasmic reticulum and hence, are more easily exported and degraded in the cytoplasm by the proteasome. This is a likely explanation for the decreased cellular content of isoform "a" (40% and 70% decrease with TNF or TSFZR75.30 respectively) and the disappearance of isoform "b" in the presence of tunicamycin (Figure 2B and Figure 4).

The isoform "x" (Mr ~75-77 kDa) (Figure 2B), became visible only in the presence of tunicamycin. Considering that one N-glycosylation modification corresponds to an added weight of 3 kDa and that VCAM1a (90-95 kDa) has six N-glycosylation sites, tunicamycin treatment could lead to isoforms that are up to 18 kDa smaller. Hence, isoform "x" could correspond to the full length core protein (9 exons) lacking all N-glycosylation modifications. At this point we cannot discard that the TSFZR75.30 induce altered glycosylation compared to that indicated by TNF. The fact that tunicamycin pretreatment abolished 50% of the cell adhesion induced by TSFZR75.30 indicates that N-glycosylated proteins such as VCAM-1 play an important role in cell adhesion, other cell adhesion molecules such as E-selectin and ICAM-1 are likely involved in this process.

We assigned VCAM-1b to the spot with a Mr ~80 kDa/pI 4.6, the spot with Mr ~83 kDa/pI 5.1-5.2 we labeled as isoform "c", which could correspond to the core protein of isoform "b", with different pI resulting from differential states of sialo-glycosylation at any of the five remaining N-glycosylation sites. Alternatively, isoform "c" could also result from the loss of exons 2 or 8, leading to a protein with a similar Mr as "b", but with an increase in the density of charge due to the preservation of all the reported glycosylation sites (Figure 2A).

The appearance of isoform "d", which was overexpressed in cells treated with TSFZR75.30, could be of potential clinical use as a biological marker for indicating the abnormal activation of endothelial cells by tumoral factors. Isoform "d" had the lowest molecular weight, which was suggestive of a smaller protein generated by alternative splicing or proteolytic processing. Interestingly when we interfered the process of N-glycosylation, isoform "d" disappeared, and a new isoform "e" (Mr ~77 kDa/pI 6.0) appeared. The fact that these two isoforms ("d" and "e") have the same apparent Mr suggests that they both correspond to the same core protein. It is likely, that the isoform "x", identified in the Figure 2-B, corresponds to

isoform e, since both were visible only in the presence of tunicamycin. According to the reported exon structure of VCAM-1, we evaluated the possibilities for the expected proteins when exons 2 (92 amino acids), 3 (107 amino acids), or 8 (89 amino acids) were eliminated. The predicted proteins had the following Mr/pI values: 68928 kDa/5.13, 66997 kDa/5.14, and 69376 kDa/5.01, indicating that none of them could produce the observed "e" isoform, which had a Mr/pI value of ~77 kDa/6.0. This analysis further supports the idea that isoform "e", is encoded by all nine exons but lacks all N-glycosylation modifications. In addition, although we cannot discard other types of posttranslational modifications such as phosphorylation that could also explain the differences in pI of the different isoforms, these modifications have not been previously described for VCAM-1. Expression of VCAM-1 isoforms in tumors has not been well studied. In the past half-century, numerous studies have dealt with the effects of TSF's on endothelial cells. These studies have demonstrated that malignant cells produce a host of factors, most notably VEGF, that favor growth and vascular permeability, facilitating the spread of tumors [43-45]. In addition to cytokines and chemokines, our study also detected significant amounts of VEGF secreted by the breast cancer cell line ZR75.30. The complex mixture of soluble factors secreted by these cells reflects the multifactorial nature of signals emitted by tumor cells that can influence endothelial behavior [46]. The specific combination of cytokines, chemokines and growth factors, observed in the TSF's could serve as a signature to distinguish between tumor cells with different metastatic or invasive potentials in breast cancer.

Conclusion

Although it has been known for some time that altered glycosylation patterns of cell surface proteins, in particular increased sialylation, are associated with cancer cell adhesion, mobility, and invasion, only recently the functional significance of these changes has begun to be understood. This study documents variants of the N-glycosylation state of VCAM-1 that can be induced in normal endothelial cells exposed to tumoral soluble factors derived from human breast cancer cells that could contribute to cell-cell adhesion and hence to malignancy [47-49].

Methods

Cell cultures

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated and cultured [50,51] by mixing cells from two or three human umbilical cords. The protocol to obtain the cells was approved by the ethics committee of the Gynecology and Obstetrics Hospital number 4 "Luis Castelazo Ayala", Mexican Institute of Social Security (IMSS), follow the principles of the Helsinki Declaration for human experimental research. Informed consent was also

obtained. The culture medium was M-199 (Gibco BRL, Grand Island, NY), supplemented with 10% fetal bovine serum (In vitro, D.F. Mexico), 1% glutamine (SIGMA, St Louis, MO), 20 µg/ml endothelial mitogen (Biomedical technologies, Stoughton, Ma), 100 µg/ml heparin (SIGMA, St Louis, Mo), and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY). Cells were grown on plastic tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA) under an atmosphere of 95% humidity and 5% CO₂ at 37°C. The cell culture reached confluence approximately 1 week after plating and presented a characteristic cobblestone appearance; cell cultures were used for all the reported experiments within their first passage. The myeloma cell line (U937) and breast cancer cell lines (ZR 75.30 and MCF-7) were obtained from ATCC, cultured in RPMI media supplemented with 10% FBS, and grown under endotoxin-free conditions.

Production of tumoral soluble factors

Breast cancer cell lines were cultured until they reached 100% confluence. The cell layer was first washed 10 times with phosphate-buffered saline (PBS) and DMEM (1:1 v/v) in order to remove serum components. Then, the flasks were incubated with 20 ml of serum free RPMI. After 48 h, the culture medium (containing the soluble products derived from the breast cancer cell lines) was collected and lyophilized following centrifugation. The resulting powder was dissolved in 1/10 of the original volume and dialyzed using a PM-10 ultra-filtration membrane (Millipore, Bedford, MA). The protein concentration was determined using the commercial Bradford reagent assay (Bio-Rad, Hercules, CA). The resulting concentrated preparation containing the tumoral soluble factors from the breast cancer cell line ZR75.30 (TSFZR75.30) or the breast cancer cell line MCF-7 (TSFMCF-7), was kept at 4°C until further use.

Adhesion assay

A suspension of U937 cells (1×10^6 cells/ml) was radio labeled with thymidine (³H) (1 µCi/ml) (NEN, Boston, MA) for 48 h. Aliquots of the labeled cell suspension (250×10^3 cells/250 µl) were added to previously prepared wells containing HUVECs that had been grown and stimulated for 3 h. The assay was performed in 48 well plates. After an additional 3 h of co-incubation, all the non-adherent U937 cells were removed by aspiration, followed by two washes with PBS. The adherent cells were then immediately lysed with 500 µl of 0.2 M NaOH and the radioactivity was measured in a scintillation counter (Beckman LS6000SC, St Louis, MO) [30].

Tunicamycin treatment

The tunicamycin concentration used was based on its N-glycan inhibitory effects on human cell cultures. HUVECs monolayers in Petri dishes were incubated with 1 µg/ml

tunicamycin (SIGMA, St Louis, MO) for 3 h followed by TNF or TSFZR75.30 treatment. The cells were harvested 6 h later [52].

Western blots

Total protein concentration was determined using the commercial Bradford reagent assay (Bio-Rad, Hercules, CA). 20 µg of total protein was used for the detection of VCAM-1. Samples were first boiled in sample buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% v/w SDS, 10%v/v glycerol, 0.1% bromophenol blue, 2% v/v 2beta-mercaptoethanol) for 5 min and separated by 10% SDS-PAGE. Then, the gels were transferred to PVDF membranes (Bio-Rad, Hercules, CA) using a Trans-Blot Cell system (Bio-Rad, Hercules, CA) in transfer buffer (25 mM Tris, 190 mM glycine, 10% methanol) at 40 V overnight [53]. The following day, the membranes were probed for 1 h with mouse anti-human VCAM-1 (CD106) antibody (sc 13160 Sta. Cruz, Sta. Cruz, CA) diluted 1:500 in TBS buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.1% Tween, 1% BSA, pH 7.5). After washing, the membranes were incubated for 1 h with horseradish peroxidase linked to antimouse immunoglobulin (Pierce Rockford, IL). The signals were detected by enhanced chemiluminescence using the supersignal system (Pierce Rockford, IL) and quantified by densitometry. As a control, actin was simultaneously detected, using a mouse anti-human actin antibody. The antibody was diluted 1:1000 and developed using the same secondary antibody and chemiluminescence system previously described [54].

Two-dimensional gel electrophoresis

Confluent cells were either left untreated or treated for 6 h with TNF or TSFZR75.30. Cells were rinsed twice with PBS containing Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺, and harvested in lysis buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea (SIGMA, St Louis, MO), and 4% w/v CHAPS (Bio-Rad, Hercules, CA). Samples were centrifuged at 18000 g for 5 min, the supernatants were recovered, and the pellets were discarded. The supernatants were then transferred to a new eppendorf tube, and the salts were removed from the samples using a 2-D Clean-up Kit (Amersham Biosciences, San Francisco, CA). 50 µg of total protein was mixed with DeStreak rehydration buffer and 0.5% IPG buffer, pH 3-10 (Amersham Biosciences Uppsala, Sweden) and applied to 7 cm IPG strips, pH 3-10 (Amersham Biosciences, San Francisco, CA), which were allowed to rehydrate for 15 h at room temperature. Separation on the first dimension was carried out using an IPGphor II isoelectric focusing system (Amersham Biosciences, Uppsala Sweden), as described by Görg in 1988 [17,55]. After the first dimension, the strips were balanced in two steps: (i) 15 min in a solution containing 6 M urea, 50 mM Tris (pH 8.8), 30% glycerol, 2% SDS, and 70 mM DTT, and (ii) 15 min in a similar solution contain 140 mM iodoacetamide. After mounting the strips on 10% acrylamide gels, vertical electrophoresis

was carried out using the Miniprotean III Bio-Rad system (Bio-Rad Hercules, CA). Proteins in the gels were visualized with the Deep-Purple stain solution (Amersham Biosciences, Bucks, UK) [1].

Deep Purple gels stain

Gels were stained according to instructions of the supplier <http://www.amershambiosciences.com/>. Briefly, the gels were first washed with distilled H₂O for 30 min, and then fixed in a solution of 7.5% acetic acid and 10% ethanol overnight. The next day, gels were stained with 5 ml of deep purple diluted in 200 mM Na₂CO₃ for 30 min and then rinsed twice, 20 min each, with 50 ml distilled H₂O containing 7.5% acetic acid. After that, gels were briefly washed in new last solution and imaged immediately in a Typhoon 9410 high performance analyzer™ using the 532 nm excitation laser. Protein spots were detected and quantified as fluorescent volumes; such a volume is the sum of the intensity of all pixels within the defined spot area. The gels with the highest number of spots were selected as reference gels and a combined warping with matching algorithm was used to create an average gel [56,57].

2D Western blots

50 µg of total protein was used for the detection of VCAM-1/actin for each of the treatments. The samples were separated in first and second dimension following the previously described protocols and transferred to an Immunoblot PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). Membranes were blocked with 0.5% milk for 1 h and probed with mouse antihuman CD106 (VCAM-1) antibody (sc 13160 Sta. Cruz, Sta. Cruz, CA) diluted 1:500 in TBS with 3% BSA overnight at 4°C, following previously described western blots protocols.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear protein extracts were obtained after treatments, in which the cells were washed, scraped, and pelleted at 4°C and then frozen in ethanol-dry ice for 1 min. The cells were immediately resuspended in 100 µl of buffer A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.9) and incubated for 10 min at 4°C. Nuclei were microcentrifuged, resuspended in 30 µl of buffer B (20 mM HEPES, 400 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF pH 7.9), and incubated on ice for 30 min. Following another 20 min microcentrifuge step, the supernatant (nuclear protein extract) was diluted with 30 µl of HDKE buffer (20 mM HEPES, 50 mM KCl, 25% glycerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.9). 10 µg of the nuclear protein extracts were incubated with γ -ATP (32P) labeled oligonucleotide containing the decameric κ B site (5'AGTTGAGGGACTTTCCAGGC 3') (Santa Cruz, Sta. Cruz, CA). The binding reactions were carried out by incubating on ice for 40 min in reaction buffer (20 mM HEPES, 50 mM

KCl, 20% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 µg/µl BSA, 1 µg/µl poly-dI-dC) (Amersham Biosciences, Uppsala Sweden). The reaction mixture was loaded onto a 7.5% non-denaturing polyacrylamide gel, and was resolved at 120 V for 4 h. The gel was dried and the DNA protein complexes were visualized by exposing the gel to a storage phosphor screen, imaged on a Storm Phosphorimager (Molecular Dynamics, San Francisco, CA), and analyzed with the ImageQuant software (Molecular Dynamics, San Francisco, CA) [58].

Bio-Plex assay

The Bio-Plex suspension array system (Bio-Rad, Hercules, CA) is a microsphere-based immunoassay, which utilizes Luminex™ beads coupled to specific antibodies, as an analyte capture platform [59]. In total, 50 µl of tumoral soluble factors secreted by the breast cancer cell line ZR75.30, was used for detecting the contents of secreted factors. The samples were added in duplicate to 96-well plates containing polystyrene beads from the 27-plex assay kit, and the beads were filter-washed twice with Bio-Plex wash buffer using a vacuum manifold (Millipore, Bedford, MA). Human cytokine standards were prepared in a range of concentrations from 32,000-0.2 pg/ml, added to the antibody-conjugated beads, and incubated in the dark on a platform shaker for 30 min. Following incubation, the samples and standards were removed by vacuum, and the beads were filter-washed three times with Bio-Plex wash buffer. Afterwards, a 1:50 dilution of biotinylated detection antibody was added to the beads, followed by incubation in the dark on a platform shaker for 30 min. The beads were washed three times and reacted with a 1:100 dilution of streptavidin-phycoerythrin (PE) for 10 min. The beads were washed three times as described above, re-suspended in Bio-Plex assay buffer, and analyzed on a Bio-Plex plate reader [59,60].

Bioinformatic tools

Sequences of VCAM-1 were taken from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) with the identification numbers: NP_001069 (VCAM-1a) and NP_542413 (VCAM-1b). Determinations of Mr/pI during the analysis of the VCAM-1 isoforms were done based on the same sequences using the Expert Protein Analysis System (ExpASY) proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB).

Statistical analysis

All data sets were analyzed using two-tails Student's *t* test.

Abbreviations

(HUVECs): Human umbilical vein endothelial cells; (TSF's): Tumoral soluble factors; (TNF): Tumoral necrosis factor; (VCAM-1): Vascular cellular adhesion molecule 1;

(2D PAGE): Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; (Mr): Relative mass; (pI): Isoelectric point.

Authors' contributions

DMS: carried out all the experiments, their analysis and wrote the manuscript. **JLV:** designed, carried out experiments and provided scientific advice to the manuscript. **SF:** isolated and established HUVECs cultures. **IM:** analyzed 2DE patterns with the software Image Master 2D Platinum. **LM:** performed the EMSA assays. **AEN** and **FVO:** provided and performed the Bio-Plex assays for the TSFs. **AZD:** designed and directed the phases of the research, analyzed the data, and critically reviewed and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are especially grateful to Dr. Guillermo Mendoza, for his supervision throughout the research and his critical review of all the experiments. We also thank Dr. Rocio Alcantara for her technical assistance with the analysis of densitometric values in western blots and Dr. Manuel Hernández from CINVESTAV-IPN, Mexico for the actin mouse antibody he kindly donated. Finally, thanks to the Biological Sciences PhD Program, UNAM, for the administrative assistance and support. During the development of this project, **DMS** was a recipient of fellowships from CONACyT and UNAM-DGEP. The project was supported also with the grant 45519M from CONACyT.

References

- Bruneel A, Labas V, Mailloux A, Sharma S, Royer N, Vinh J, Pernet P, Vaubourdolle M, Baudin B: **Proteomics of human umbilical vein endothelial cells applied to etoposide-induced apoptosis.** *Proteomics* 2005, **5(15)**:3876-3884.
- Zetter BR: **Adhesion molecules in tumor metastasis.** *Semin Cancer Biol* 1993, **4(4)**:219-229.
- Ajani J, Allgood V: **Molecular mechanisms in cancer: what should clinicians know?** *Semin Oncol* 2005, **32(6 Suppl 8)**:2-4.
- Varki A: **Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct.** *Glycobiology* 1993, **3(2)**:97-130.
- Breen KC, Coughlan CM, Hayes FD: **The role of glycoproteins in neural development function, and disease.** *Mol Neurobiol* 1998, **16(2)**:163-220.
- Vaughn DE, Bjorkman PJ: **The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules.** *Neuron* 1996, **16(2)**:261-273.
- Sgroi D, Varki A, Braesch-Andersen S, Stamenkovic I: **CD22, a B cell-specific immunoglobulin superfamily member, is a sialic acid-binding lectin.** *J Biol Chem* 1993, **268(10)**:7011-7018.
- Koukoulis GK, Patriarca C, Gould VE: **Adhesion molecules and tumor metastasis.** *Hum Pathol* 1998, **29(9)**:889-892.
- Carson-Walter EB, Watkins DN, Nanda A, Vogelstein B, Kinzler KW, St Croix B: **Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans.** *Cancer Res* 2001, **61(18)**:6649-6655.
- Byrne GJ, Ghellal A, Iddon J, Blann AD, Venizelos V, Kumar S, Howell A, Bundred NJ: **Serum soluble vascular cell adhesion molecule-1: role as a surrogate marker of angiogenesis.** *J Natl Cancer Inst* 2000, **92(16)**:1329-1336.
- Madhavan M, Srinivas P, Abraham E, Ahmed I, Vijayalekshmi NR, Balam P: **Down regulation of endothelial adhesion molecules in node positive breast cancer: possible failure of host defence mechanism.** *Pathol Oncol Res* 2002, **8(2)**:125-128.
- Holmes-McNary M: **Nuclear factor kappa B signaling in catabolic disorders.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002, **5(3)**:255-263.
- Koch AE, Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ: **Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1.** *Nature* 1995, **376(6540)**:517-519.
- Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJ: **Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1992, **187(2)**:584-589.
- Rice GE, Bevilacqua MP: **An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion.** *Science* 1989, **246(4935)**:1303-1306.
- Kamada H, Tsutsumi Y, Kihira T, Tsunoda S, Yamamoto Y, Mayumi T: **In vitro remodeling of tumor vascular endothelial cells using conditioned medium from various tumor cells and their sensitivity to TNF-alpha.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **268(3)**:809-813.
- Oh P, Li Y, Yu J, Durr E, Krasinska KM, Carver LA, Testa JE, Schnitzer JE: **Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy.** *Nature* 2004, **429(6992)**:629-635.
- Utoguchi N, Mizuguchi H, Dantakean A, Makimoto H, Wakai Y, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Mayumi T: **Effect of tumour cell-conditioned medium on endothelial macromolecular permeability and its correlation with collagen.** *Br J Cancer* 1996, **73(1)**:24-28.
- Estrada-Bernal A, Mendoza-Milla C, Ventura-Gallegos JL, Lopez-Bojorquez LN, Miranda-Peralta E, Arechavaleta-Velasco F, Vadillo-Ortega F, Sanchez-Sanchez L, Zentella-Dehesa A: **NF-kappaB dependent activation of human endothelial cells treated with soluble products derived from human lymphomas.** *Cancer Lett* 2003, **191(2)**:239-248.
- Simiantonaki N, Jayasinghe C, Kirkpatrick CJ: **Effect of pro-inflammatory stimuli on tumor cell-mediated induction of endothelial cell adhesion molecules in vitro.** *Exp Mol Pathol* 2002, **73(1)**:46-53.
- van Rossen ME, Hofland LJ, Tol MP van den, van Koetsveld PM, Jeekel J, Marquet RL, van Eijck CH: **Effect of inflammatory cytokines and growth factors on tumour cell adhesion to the peritoneum.** *J Pathol* 2001, **193(4)**:530-537.
- Kaji M, Ishikura H, Kishimoto T, Omi M, Ishizu A, Kimura C, Takahashi T, Kato H, Yoshiki T: **E-selectin expression induced by pancreas-carcinoma-derived interleukin-1 alpha results in enhanced adhesion of pancreas-carcinoma cells to endothelial cells.** *Int J Cancer* 1995, **60(5)**:712-717.
- Nizamutdinova IT, Lee GW, Lee JS, Cho MK, Son KH, Jeon SJ, Kang SS, Kim YS, Lee JH, Seo HG, et al.: **Tanshinone I suppresses growth and invasion of human breast cancer cells, MDA-MB-231, through regulation of adhesion molecules.** *Carcinogenesis* 2008.
- McArthur HL, Dickler MN: **Biomarkers in breast cancer.** *Cancer Biol Ther* 2008, **7(1)**:21-22.
- Gosk S, Moos T, Gottstein C, Bendas G: **VCAM-1 directed immunoliposomes selectively target tumor vasculature in vivo.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1778(4)**:854-863.
- Liotta LA, Kohn EC: **The microenvironment of the tumour-host interface.** *Nature* 2001, **411(6835)**:375-379.
- Quaranta V, Giannelli G: **Cancer invasion: watch your neighbourhood!** *Tumori* 2003, **89(4)**:343-348.
- Castilla MA, Neria F, Renedo G, Pereira DS, Gonzalez-Pacheco FR, Jimenez S, Tramon P, Deudero JJ, Arroyo MV, Yague S, et al.: **Tumor-induced endothelial cell activation: role of vascular endothelial growth factor.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, **286(5)**:C1170-1176.
- Bogenrieder T, Herlyn M: **Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis.** *Oncogene* 2003, **22(42)**:6524-6536.
- Lopez-Bojorquez LN, Arechavaleta-Velasco F, Vadillo-Ortega F, Montes-Sanchez D, Ventura-Gallegos JL, Zentella-Dehesa A: **NF-kappaB translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF-alpha and IL-1beta.** *Inflamm Res* 2004, **53(10)**:567-575.
- Gabraith SM, Chaplin DJ, Lee F, Stratford MR, Locke RJ, Vojnovic B, Tozer GM: **Effects of combretastatin A4 phosphate on endothelial cell morphology in vitro and relationship to tumour vascular targeting activity in vivo.** *Anticancer Res* 2001, **21(1A)**:93-102.
- Girdhar G, Chen Y, Shao JY: **Double-tether extraction from human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells.** *Biophys J* 2007, **92(3)**:1035-1045.

33. Park HJ, Zhang Y, Georgescu SP, Johnson KL, Kong D, Galper JB: **Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis.** *Stem Cell Rev* 2006, **2(2)**:93-102.
34. Murakami T, Matakai C, Nagao C, Umetani M, Wada Y, Ishii M, Tsutsumi S, Kohro T, Saiura A, Aburatani H, et al.: **The gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor alpha using DNA microarray analysis.** *J Atheroscler Thromb* 2000, **7(1)**:39-44.
35. Rogers JA, Fuseler JW: **Regulation of NF-kappaB activation and nuclear translocation by exogenous nitric oxide (NO) donors in TNF-alpha activated vascular endothelial cells.** *Nitric Oxide* 2007, **16(3)**:379-391.
36. Lopez-Bojorquez LN: **[Regulation of NF-kappaB transcription factor. A molecular mediator in inflammatory process].** *Rev Invest Clin* 2004, **56(1)**:83-92.
37. Ji JY, Jing H, Diamond SL: **Hemodynamic regulation of inflammation at the endothelial-neutrophil interface.** *Ann Biomed Eng* 2008, **36(4)**:586-595.
38. Kobayashi H, Boelte KC, Lin PC: **Endothelial cell adhesion molecules and cancer progression.** *Curr Med Chem* 2007, **14(4)**:377-386.
39. Mantovani A, Sozzani S, Vecchi A, Introna M, Allavena P: **Cytokine activation of endothelial cells: new molecules for an old paradigm.** *Thromb Haemost* 1997, **78(1)**:406-414.
40. Celis JE, Gromov P: **High-resolution two-dimensional gel electrophoresis and protein identification using western blotting and ECL detection.** *Exs* 2000, **88**:55-67.
41. Gromov PS, Ostergaard M, Gromova I, Celis JE: **Human proteomic databases: a powerful resource for functional genomics in health and disease.** *Prog Biophys Mol Biol* 2002, **80(1-2)**:3-22.
42. Matthies H Jr, Kretlow J, Matthies H, Smalla KH, Staak S, Krug M: **Glycosylation of proteins during a critical time window is necessary for the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region.** *Neuroscience* 1999, **91(1)**:175-183.
43. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G: **Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis.** *J Exp Med* 1971, **133(2)**:275-288.
44. Folkman J: **Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction.** *Cancer Metastasis Rev* 1990, **9(3)**:171-174.
45. Ferrara N: **Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis.** *Recent Prog Horm Res* 2000, **55**:15-35. discussion 35-16
46. Umetani M, Matakai C, Minegishi N, Yamamoto M, Hamakubo T, Kodama T: **Function of GATA transcription factors in induction of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 by tumor necrosis factor-alpha.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, **21(6)**:917-922.
47. Campbell BJ, Yu LG, Rhodes JM: **Altered glycosylation in inflammatory bowel disease: a possible role in cancer development.** *Glycoconj J* 2001, **18(11-12)**:851-858.
48. Suzuki O, Nozawa Y, Abe M: **The regulatory roles of cell surface sialylation and N-glycans in human B cell lymphoma cell adhesion to galectin-I.** *Int J Oncol* 2006, **28(1)**:155-160.
49. Kyselova Z, Mechref Y, Kang P, Goetz JA, Dobrolecki LE, Sledge GW, Schnaper L, Hickey RJ, Malkas LH, Novotny MV: **Breast Cancer Diagnosis and Prognosis through Quantitative Measurements of Serum Glycan Profiles.** *Clin Chem* 2008, **54(7)**:1166-1175.
50. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: **Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.** *J Clin Invest* 1973, **52(11)**:2745-2756.
51. Horrevoets AJ, Fontijn RD, van Zonneveld AJ, de Vries CJ, ten Cate JW, Pannekoek H: **Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor-alpha in vitro are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes.** *Blood* 1999, **93(10)**:3418-3431.
52. Alpaugh ML, Lee MC, Nguyen M, Deato M, Dishakjian L, Barsky SH: **Myoepithelial-specific CD44 shedding contributes to the anti-invasive and antiangiogenic phenotype of myoepithelial cells.** *Exp Cell Res* 2000, **261(1)**:150-158.
53. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227(5259)**:680-685.
54. Mendoza-Milla C, Machuca Rodriguez C, Cordova Alarcon E, Estrada Bernal A, Toledo-Cuevas EM, Martinez Martinez E, Zentella Dehesa A: **NF-kappaB activation but not PI3K/Akt is required for dexamethasone dependent protection against TNF-alpha cytotoxicity in L929 cells.** *FEBS Lett* 2005, **579(18)**:3947-3952.
55. Gorg A, Postel W, Gunther S, Weser J, Strahler JR, Hanash SM, Somerlot L, Kuick R: **Approach to stationary two-dimensional pattern: influence of focusing time and immobiline/carrier ampholytes concentrations.** *Electrophoresis* 1988, **9(1)**:37-46.
56. Chevalier F, Rofidal V, Vanova P, Bergoin A, Rossignol M: **Proteomic capacity of recent fluorescent dyes for protein staining.** *Phytochemistry* 2004, **65(11)**:1499-1506.
57. Harris LR, Churchward MA, Butt RH, Coorsen JR: **Assessing detection methods for gel-based proteomic analyses.** *J Proteome Res* 2007, **6(4)**:1418-1425.
58. Machuca C, Mendoza-Milla C, Cordova E, Mejia S, Covarrubias L, Ventura J, Zentella A: **Dexamethasone protection from TNF-alpha-induced cell death in MCF-7 cells requires NF-kappaB and is independent from AKT.** *BMC Cell Biol* 2006, **7**:9.
59. de Jager W, te Velthuis H, Prakken BJ, Kuis W, Rijkers GT: **Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2003, **10(1)**:133-139.
60. Azizan A, Sweat J, Espino C, Gemmer J, Stark L, Kazanis D: **Differential proinflammatory and angiogenesis-specific cytokine production in human pulmonary endothelial cells, HPMEC-ST1.6R infected with dengue-2 and dengue-3 virus.** *J Virol Methods* 2006, **138(1-2)**:211-217.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

