



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTANDARIZACIÓN DE UN ENSAYO DE PERMEABILIDAD VASCULAR *IN VIVO* SENSIBLE A FACTORES SOLUBLES SECRETADOS POR LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA ZR75-30

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

CÉSAR ALEJANDRO GUZMÁN PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO
FACULTAD DE QUÍMICA

DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D. F., ABRIL DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo no se hubiera realizado sin el apoyo del Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

Los experimentos de esta tesis fueron realizados con los ratones autorizados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Cinvestav con el número de protocolo 0019-12.

Durante el periodo de realización de este trabajo CONACYT me apoyó con una beca de posgrado, siendo el becario 245198.

Agradezco a:

Layla Ortiz García por su ayuda en la creación y edición de este documento.

La Dra. Martha Patricia Coello Coutiño y a la Dra. Rosa Estela Navarro, miembros de mi comité tutor de maestría, por sus observaciones al proyecto los últimos dos años.

La Dra. Claudia González Espinosa y a su equipo de trabajo por permitirme realizar gran parte de los experimentos en su laboratorio; en especial al M. en C. Alfredo Ibarra Sánchez por su apoyo técnico para la inyección en la vena caudal.

Los revisores de la tesis: Dr. Alejandro García Carrancá, Dra. María Elena Ibarra Rubio, Dra. Marcela Lizano Soberón, Dr. Juan Miranda Ríos y Dra. Martha Robles Flores.

El M. en C. José Luís Ventura Gallegos por su apoyo técnico durante la realización de este proyecto.

Para la realización de este proyecto fueron necesarios cientos de litros de café, gracias a todos los que lo financiaron y/o lo disfrutaron conmigo (incluso a distancia, del otro lado del teléfono o la pantalla). En especial a Ceci, Joaquín, Layla, Lupis, Alf, Pipe, Eyline, Leonardo, Anet y Jimena.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	2
2. RESUMEN	4
3. ABSTRACT	6
4. INTRODUCCIÓN	8
4.1. Incidencia del cáncer de mama	8
4.2. Metástasis	11
4.3. Endotelio	12
4.4. Permeabilidad vascular	14
4.5. Factores que afectan la permeabilidad vascular	16
4.6. Endotelio e inflamación	19
4.7. Extravasación de leucocitos	20
4.8. Inflamación y metástasis	23
4.9. Estado premetastásico	24
5. ANTECEDENTES	27
5.1. Efecto de los factores solubles tumorales en la activación de células endoteliales <i>in vitro</i>	27
5.2. Técnicas para medir la permeabilidad vascular <i>in vivo</i>	28
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
7. HIPÓTESIS	33
8. OBJETIVOS	33
9. MATERIAL Y MÉTODOS	34
10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	39
11. RESULTADOS	40
12. DISCUSIÓN	48
13. CONCLUSIONES	61
14. PERSPECTIVAS	62
15. ANEXOS	63
16. REFERENCIAS	72

ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
BAY117085	Inhibidor de la vía de señalización NF-κB
CC	Quimiocinas que tienen dos cisteínas adyacentes cerca de su extremo amino
CCR7	Receptor tipo 7 de quimiocinas
CD99	Cluster de diferenciación 99 (también llamado MIC2)
CXC	Quimiocinas que presentan un aminoácido entre dos cisteínas cerca de su extremo amino
CXCR1	Receptor 1 de quimiocinas del tipo CXC
CXCR2	Receptor 2 de quimiocinas del tipo CXC
DNP	Dinitrofenol
E-caderina	Caderina epitelial
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
E-selectina	Selectina endotelial
FST	Factores solubles tumorales
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HEV	Vénulas endoteliales altas
HUVEC	Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN-γ	Interferón gama
IgE/antígeno	Complejo formado por la inmunoglobulina E y su antígeno, en este trabajo es dinitrofenol
IgM	Inmunoglobulina M
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
JAM-1	Molécula de adhesión de las uniones 1
LFA-1	Antígeno asociado a la función de los linfocitos 1
Mac-1	Antígeno de macrófago 1
MCP-1	Proteína quimiotrayente de monocitos 1, también llamada CCL2
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NO	Óxido nítrico
NRP1	Neuropilina 1
OD	Densidades ópticas

PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PECAM-1/CD31	Molécula de adhesión plaqueto-endotelial
PGI2	Prostaciclina
PNAd	Adresina de nódulo linfático periférico
P-selectina	Selectina de plaquetas y endotelio
PV-1	Proteína de vesícula plasmalemal
Rho/Rac	GTPasas pequeñas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
SAPK2/p38	Proteína cinasa activada por el estrés/p38
SFB	Suero Fetal Bovino
T CD8 ⁺	Linfocito T citotóxico
TEM	Migración trans-endotelial
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares 1
VE-caderina	Caderina vascular endotelial
VEGF-1	Factor de crecimiento del endotelio vascular tipo 1 (también llamado tipo A)
VEGFR1	Receptor 1 del factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR2	Receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular
VLA-4	Antígeno muy tardío 4 (Integrina alfa4beta1)
VVOs	Organelos vesículo-vacuolares
WHO	Organización mundial de la salud (World Health Organization)
ZO-1	Proteína de la zona ocluyente 1
ZO-2	Proteína de la zona ocluyente 2

RESUMEN

El cáncer de mama afecta a mujeres de todos los niveles socioeconómicos. Este tipo de cáncer es el más diagnosticado y el que causa mayor número de muertes en las mexicanas; en 2008 se diagnosticaron 13,939 nuevos casos y 5,217 defunciones.

La mayoría de las muertes por cáncer se deben a la formación de múltiples tumores secundarios. Para formarlos, las células necesitan liberarse del tumor primario y entrar al torrente sanguíneo o a los vasos linfáticos, logrando con esto una amplia distribución; además, deben ser capaces de sobrevivir en el torrente sanguíneo, arrestarse en la vasculatura y extravasarse. Durante el proceso de extravasación, las células tumorales deben interactuar con las células endoteliales, debido a que éstas se encargan de regular la permeabilidad vascular y la migración trans-endotelial.

Un incremento en la permeabilidad endotelial puede acelerar el proceso metastásico mediante la facilitación de la transmigración de células cancerosas. Se ha demostrado que algunas líneas celulares de cáncer liberan factores solubles capaces de activar al endotelio, sin que haya interacción entre células; la activación del endotelio a distancia se ha llamado estado pre-metastásico, ya que esto facilitaría la extravasación de células tumorales circulantes.

No se ha estudiado el efecto de los factores solubles tumorales (FST) de cáncer de mama sobre la permeabilidad vascular *in vivo*, ya que no se cuenta con un modelo adecuado. Por esto, en el presente trabajo se adaptó el ensayo de Miles para cuantificar la permeabilidad vascular inducida por los FST en piel de ratones Swiss Webster. El ensayo de Miles consiste en administrar un agente proinflamatorio en la piel y un colorante vía intravenosa, al aumentar la permeabilidad vascular el colorante se extravasa y tiñe la piel.

Se generaron dos controles positivos con agentes que modifican la permeabilidad vascular. Como control de inyección en la vena caudal se utilizaron 280 ng de IgE anti-DNP administrados en la oreja, y como control de permeabilidad en dorso se utilizaron 25 ng de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-1). Se administró azul de Evans y DNP vía intravenosa, se evaluó la permeabilidad al extraer el colorante de las zonas tratadas y cuantificarlo por espectrofotometría a 620 nm.

La identificación de factores que influyen en el área e intensidad de la marca en piel permitió la optimización de la técnica, fue posible probar una mayor cantidad de muestras al mismo tiempo. Se encontró que la profundidad de la inyección es muy importante, debe ser intradérmica; el VEGF-1 y los FST fueron administrados en una inyección intradérmica, 15 min después de la inyección de azul de Evans.

La permeabilidad vascular basal en los ratones Swiss Webster es de 0.046 unidades de densidad óptica a 620 nm; al aplicar el control de 25 ng de VEGF-1, la permeabilidad es 2.41 veces la basal; mientras que con los FST de ZR75-30, llegó a 2.13 veces el nivel basal.

El sistema para evaluar la permeabilidad vascular *in vivo* que se montó es reproducible y sensible a la inducción, tanto por el complejo IgE/antígeno, como por el VEGF-1 y los FST de la línea de cáncer de mama ZR75-30.

La estandarización de un ensayo de permeabilidad vascular *in vivo* sensible a factores solubles tumorales, permitió obtener un modelo para estudiar el efecto de los factores solubles tumorales sobre la permeabilidad endotelial; este modelo permitirá estudiar las interacciones entre el endotelio, células del sistema inmune y cancerosas durante el proceso de metástasis.

Abstract

Breast cancer affects women of all socioeconomic backgrounds. This type of cancer is the most diagnosed, and causes the largest amount of deaths among Mexican women, e. i., in 2008, there were 13,939 new cases and 5,217 deaths.

The majority of deaths are caused because a secondary tumor is formed. For these tumors to be formed, cells must be released from a primary tumor, they must enter the blood stream or the lymphatic vessels, which allows their distribution; and they must be capable of surviving in the blood stream, arrested themselves in the vasculature of the target organs and extravasate themselves. During the extravasation process, the tumor cells must interact with the endothelial cells, because the endothelial cells are the ones that regulate the vascular permeability and the trans-endothelial migration processes.

An increase in the endothelial permeability can accelerate the metastasis process thus facilitating the transmigration of cancer cells. It has been demonstrated that some cancer cell lines release soluble factors that activate the endothelium, without an interaction between cells; the activation at a distance of the endothelium is called pre-metastatic state, because it could facilitate the extravasation of circulating tumor cells.

To date, the effect of the breast cancer tumoral soluble factors (FST) upon the vascular permeability *in vivo* has not been studied yet, mainly because there is no adequate model for this. That is why, in this work the Miles Essay has been adapted to quantify the vascular permeability that is induced by the tumoral soluble factors in the skin of Swiss Webster mice. The Miles assay implies introducing a pro-inflammatory agent in the skin and a dye intravenously, the increase on vascular permeability will allow the extravasation of the dye and thus the skin will be stained.

Two positive controls were generated with agents that modify the vascular permeability. As a control of the caudal vein injection 280 ng of IgE anti-DNP were used, they were applied in the ear, and as a control of the permeability on the back (dorsal area) 25 ng of the vascular endothelial growth factor (VEGF-1) were used. The Evans blue dye and DNP were administered intravenously, then, the

permeability was evaluated by the extraction of the extravasated dye of the treated areas and it was quantified by spectrophotometry at 620 nm.

The identification of factors that influence the area and intensity of the skin marks allowed us to do an optimization of the technique, to test a larger amount of experimental samples at the same time. We found that the depth of the injection is important, it must be intradermic; the VEGF-1 and FST were administered on an intradermal injection, 15 minutes after the Evans blue dye.

The basal vascular permeability in the Swiss Webster mice was 0.046 OD (optical density units) at 620 nm; with the administration of the 25 ng of VEGF-1 as a control, the permeability was 2.41 times the basal level; while the FST of ZR75-30, was 2.13 times the basal level.

The permeability system *in vivo* that was set up is reproducible and sensitive to the IgE/antigen complex, to VEGF-1 and to the tumoral soluble factors of the ZR75-30 cancer cell line.

The standardization of a vascular permeability essay *in vivo* that is sensitive to tumoral soluble factors, allows us to have a model to study the effect of tumor soluble factors on endothelial permeability; this model allows the study of the interactions between the endothelium, the immune system cells and the cancer cells during the metastasis process.

INTRODUCCIÓN

Incidencia del cáncer de mama

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO), el cáncer es la principal causa de muerte por enfermedades no transmisibles en los países desarrollados y la segunda en los países en desarrollo (WHO, 2011). A nivel mundial, en 2008, se registraron 12.7 millones de nuevos casos y 7.6 millones de defunciones por cáncer; el 56% de los casos y el 64% de las muertes ocurrieron en países en desarrollo (Jemal *et al.*, 2011). Los tipos de cáncer más comunes son: el de pulmón, el de mama, el colorrectal, el de estómago y el de próstata. No obstante, los que causan más muertes son el de pulmón, el de estómago, el de hígado, el colorrectal y el de mama (Ferlay *et al.*, 2010) (Fig. 1).

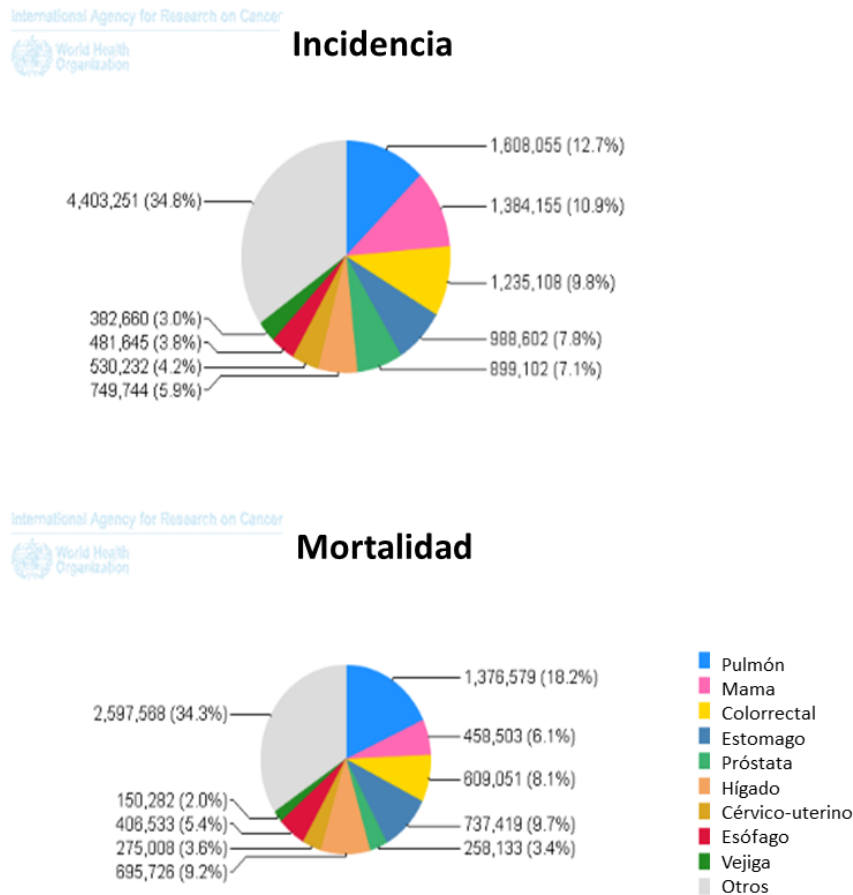


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial, ambos sexos. Modificado de Globocan 2008 (Ferlay *et al.*, 2010).

Distintos tipos de cáncer afectan a determinados segmentos de la población; influyen en este patrón múltiples factores como género, raza, estilo de vida, etc. El

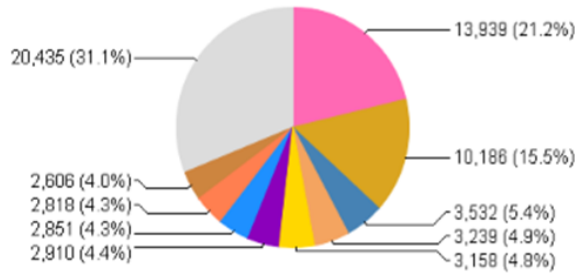
cáncer de mama es el segundo más detectado en el mundo y el quinto en mortalidad, lo que representa el 10.9 y 6.1%, respectivamente (Ferlay *et al.*, 2010). En el cáncer de mama, el género es un factor determinante, se presenta con una frecuencia de 100 mujeres por cada hombre afectado, es el más diagnosticado y el que más muertes genera en mujeres, tanto en países desarrollados como en países en desarrollo (Jemal *et al.*, 2011).

En 2008 se detectaron aproximadamente 690,000 nuevos casos de cáncer de mama en los países desarrollados y 690,000 en los países en desarrollo; dando un total de 1,384,155 nuevos casos de cáncer de mama, lo que representa el 22.9% de los detectados en mujeres. La incidencia a nivel mundial es 38.9 casos por cada 100 mil mujeres; en países desarrollados es de 66.4, mientras que es 27.3 en los países en desarrollo. La diferencia en los estilos de vida entre países desarrollados y en desarrollo puede afectar el patrón de incidencia del cáncer de mama; entre los principales factores están los patrones reproductivos, la cobertura del sistema de salud y los fondos genéticos (Jemal *et al.*, 2011).

Las muertes por cáncer de mama sumaron 458,503 en todo el mundo durante 2008, lo que representa el 13.7% de las muertes por cáncer en mujeres. Aunque la incidencia del cáncer de mama es menor en países en desarrollo, hay un mayor número de muertes; se registraron aproximadamente 189,500 defunciones en países desarrollados, mientras que en los países en desarrollo hubo cerca de 269,900; aproximadamente el 60% de la muertes ocurrieron en países en desarrollo (Ferlay *et al.*, 2010; Jemal *et al.*, 2011).

El cáncer de mama es el más diagnosticado en mujeres mexicanas, con 13,939 nuevos casos en 2008, el 21.2% de los detectados (Fig. 2), afecta a mujeres adultas de todos los niveles de ingreso; con una incidencia aproximada de 25 por cada 100 mil mexicanas (Ferlay *et al.*, 2010). La tasa de mortalidad se elevó de manera sostenida en las pasadas décadas, hasta llegar a una cifra cercana a 9 por cada 100 mil (Fig. 3). En 2008 se llegó a 5,217 defunciones, por lo que es la neoplasia que genera más muertes en las mujeres mexicanas, el 13.3% de las muertes por cáncer; el 60% de las mujeres que mueren tienen entre 30 y 59 años (Knaul *et al.*, 2008).

Incidencia



Mortalidad

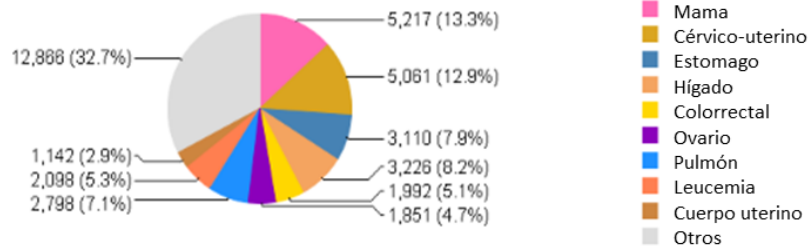
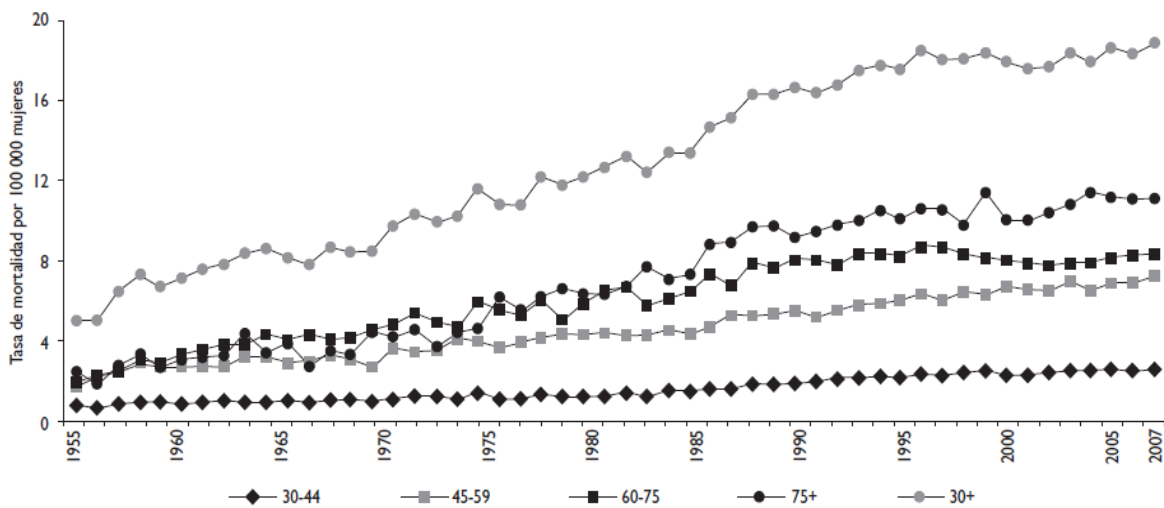


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en mujeres mexicanas. Modificado de Globocan 2008 (Ferlay *et al.*, 2010).



*Tasas ajustadas por edad por 100 000 mujeres presentadas a edad promedio

Figura 3. Tasa de mortalidad por cáncer de mama en mujeres mexicanas. Tomado de Knaul FM *et al.*, 2008.

Metástasis

Las muertes por cáncer están relacionadas con la habilidad del tumor primario para formar tumores secundarios en órganos distantes; en general, los tumores primarios responden mejor al tratamiento: cirugía sola o combinada con quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia (Calorini y Bianchini., 2010).

El cáncer es una enfermedad en la que las células escapan de los mecanismos normales de control de crecimiento y proliferan sin regulación. Si las células malignas permanecen en una sola masa, como ocurre a menudo en algunos tipos de cáncer cutáneo o tiroideo, los tumores pueden ser extirpados quirúrgicamente sin que exista un riesgo mayor a la salud. La diseminación de un tumor dentro del cuerpo recibe el nombre de metástasis; mientras más agresivo sea un cáncer mayor será su potencial para generar metástasis y mayor el riesgo de muerte (Kopfstein *et al.*, 2006).

La formación de metástasis es un proceso complejo que envuelve múltiples eventos. Primero, las células tumorales se liberan del tumor primario e invaden el tejido circundante y su matriz extracelular; para lograr esto, deben alterar el patrón de expresión de las moléculas de adhesión intercelular, ejemplo de esto es la disminución de E-caderina y el aumento en la síntesis y secreción de metaloproteasas (Sahai, 2007). El movimiento de las células cancerosas es de tipo ameboideo y se da por ciclos de polimerización de actina, adhesión celular y contracción de actino-miosina; es muy semejante al de las células del sistema inmune. Posteriormente, las células tumorales entran al torrente sanguíneo o los vasos linfáticos, lo que permite una amplia distribución. A nivel celular la metástasis es un proceso poco eficiente, aunque muchas células puedan intravasarse, pocas logran sobrevivir al estrés mecánico del torrente sanguíneo y a los componentes citotóxicos del sistema inmune (Gupta *et al.*, 2006).

La célula metastásica no sólo debe ser capaz de intravasarse, sino también de sobrevivir en el torrente sanguíneo, arrestarse en la microvasculatura del órgano blanco y extravasarse, esto ocurre en las vénulas postcapilares de los órganos blanco. El arresto embólico es el que se da cuando las células metastásicas son demasiado grandes para pasar por la microvasculatura, depende del tamaño del vaso, de las células y del agregado de plaquetas que puedan generar. Las células tumorales también pueden adherirse a la pared del vaso cuando no hay una

restricción espacial en su diámetro, incluso algunas proliferan adheridas a la pared (Sahai, 2007) (Fig. 4).

La extravasación se produce unas horas después del proceso de arresto, y requiere una reorganización del citoesqueleto, no sólo en las células metastásicas sino también en las células del endotelio; de este modo las células cancerosas pueden formar protrusiones y pasar a través de espacios generados en la monocapa endotelial (Sahai, 2007).

La mayoría de las células tumorales que logran extravasarse no logran colonizar efectivamente el tejido, son eliminadas o permanecen en un estado de dormancia; en esto podría influir la incapacidad en inducir angiogénesis en el órgano secundario (Stegg y Theodorescu, 2008). Para lograr proliferar, las células tumorales deben beneficiarse o modificar el nuevo microambiente, interactuando con las células del tejido y del endotelio vascular (Nguyen *et al.*, 2006).

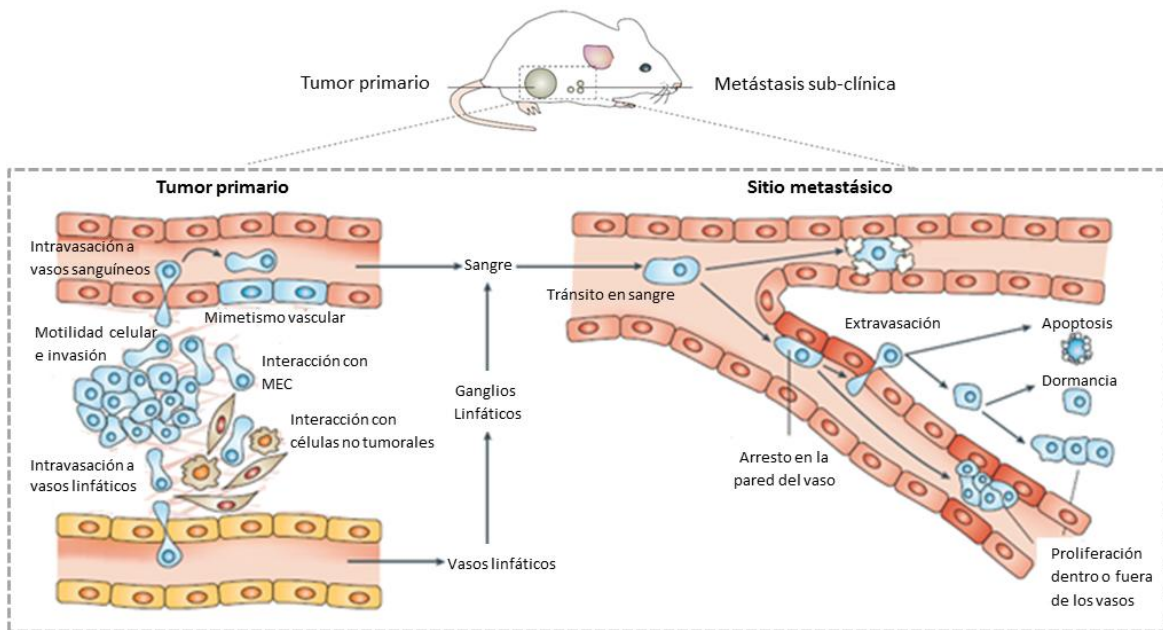


Figura 4. Esquema general del proceso de metástasis. Modificado de Sahai, 2007.

Endotelio

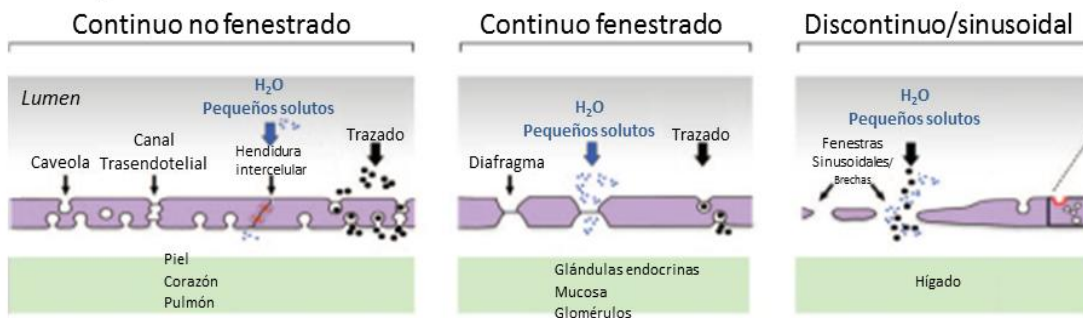
Se denomina endotelio vascular al epitelio escamoso simple que delimita los vasos sanguíneos y linfáticos. El endotelio se encuentra en la túnica íntima, una de las tres capas por las que están compuestos los vasos. La adventicia y la media son las otras dos capas, éstas representan el esqueleto estructural de los vasos. La íntima

es la capa más interna y está formada por el endotelio, la matriz subendotelial, una fina capa de tejido conjuntivo laxo y una hoja elástica. Las células endoteliales están ancladas a la matriz subendotelial, que es una estructura organizada compuesta de colágeno, elastina, laminina, factor de von Willebrand, y otros elementos; en el corazón la túnica íntima se llama endocardio (Body, 2006).

El endotelio es una superficie bioquímicamente activa, tiene un área de 1,000-5,000 m², actúa como un órgano difuso; puede detectar cambios mecánicos, químicos y humorales en el medio. Además, entre su funciones se encuentra controlar el proceso trombogénico y regular el microambiente de los tejidos, facilita el paso de nutrientes al tejido adyacente, permite o inhibe la remodelación vascular, modifica el tono vascular, regula la inflamación y la función inmune (Body, 2006).

El endotelio presenta heterogeneidad en cuanto a su función y forma, a través del árbol vascular. Esta heterogeneidad puede observarse en los tres diferentes tipos de endotelio existentes (Fig. 5). En el endotelio continuo no fenestrado las células endoteliales están muy interconectadas con las adyacentes y presentan una membrana basal continua; es el que se encuentra en las arterias, venas y capilares del cerebro, piel, corazón y pulmones (Aird, 2007).

A Capilar



B Vénula post-capilar

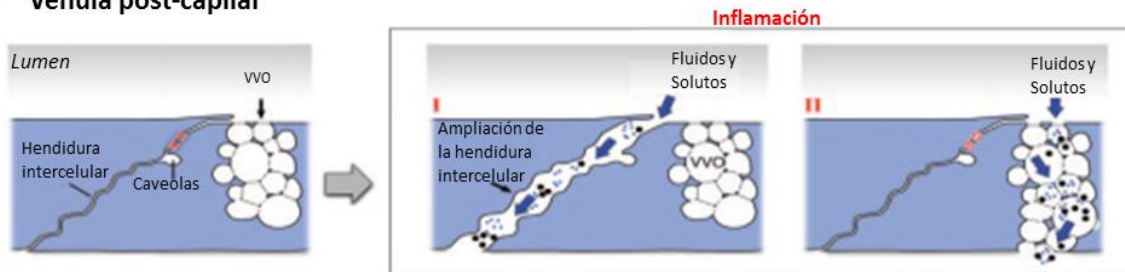


Figura 5. Tipos de endotelio. Modificado de Aird, 2007.

En el endotelio continuo fenestrado hay un incremento en el transporte transendotelial; se encuentra en lugares que incluyen la mucosa de las glándulas exocrinas y endocrinas, la mucosa gástrica e intestinal, el plexo coroideo, los glomérulos y una subpoblación de túbulos renales. Este tipo de endotelio se caracteriza por la presencia de fenestras, poros transcelulares de alrededor de 70 nm de diámetro, que se extienden a través de todo el espesor de la célula. La mayoría de las fenestras poseen un diafragma no membranoso delgado, de 5-6 nm, a través de su apertura. Con la excepción de los glomérulos, los diafragmas fenestrales contienen a la glicoproteína integral de membrana PV-1. La presencia de un diafragma puede proporcionar a las fenestras una mayor selectividad al tamaño. La densidad de fenestras varía entre los lechos vasculares (Aird, 2007).

El endotelio discontinuo se encuentra en algunos lechos vasculares sinusoidales, sobre todo en el hígado. En contraste con el endotelio continuo fenestrado, las células endoteliales sinusoidales del hígado poseen grandes fenestraciones de 100 a 200 nm de diámetro que carecen de diafragma y contienen huecos (o poros circulares grandes) entre las células individuales; la membrana basal subyacente está pobremente formada (Aird, 2007).

Permeabilidad vascular

El endotelio regula una variedad de funciones, incluyendo el tono del músculo liso vascular, las reacciones de defensa del huésped, la angiogénesis y la hemostasia de la sangre, es decir, que se mantenga fluida. El mantenimiento del endotelio como una barrera semipermeable es especialmente importante para controlar el paso de fluidos y macromoléculas entre la sangre y el espacio intersticial. Se sabe que la pérdida de esta función produce inflamación de los tejidos (Mehta y Malik, 2006; Body, 2006)

El endotelio permite la transferencia sin obstáculos de gases disueltos, iones y solutos de bajo peso molecular, que presenten una diferencia de concentración entre el plasma y el intersticio, la difusión pasiva es la principal forma de transporte de estos solutos. La pared del vaso es restrictiva a las sustancias de alto peso molecular, como las proteínas. El endotelio vascular transporta solutos con una gama de radios moleculares de 0.1 nm (iones de sodio) a 11.5 nm (IgM), la barrera endotelial se comporta como un tamiz molecular con un radio medio de poro de 3 nm (Mehta y Malik, 2006). La permeabilidad es inversamente proporcional al radio

molecular hasta llegar a los 3 nm, después de este punto no se encuentra diferencia entre el radio molecular y la tasa de transporte, ya que prácticamente no hay transporte pasivo. Esto quiere decir que sólo las partículas con un radio menor a 3 nm pueden atravesar libremente el endotelio (Mehta y Malik, 2006).

La permeabilidad vascular se puede dividir en dos tipos principales: basal e inducible. Bajo condiciones basales hay un flujo continuo y regulado de material entre la sangre y el intersticio subyacente. Esta actividad se desarrolla principalmente en los capilares.

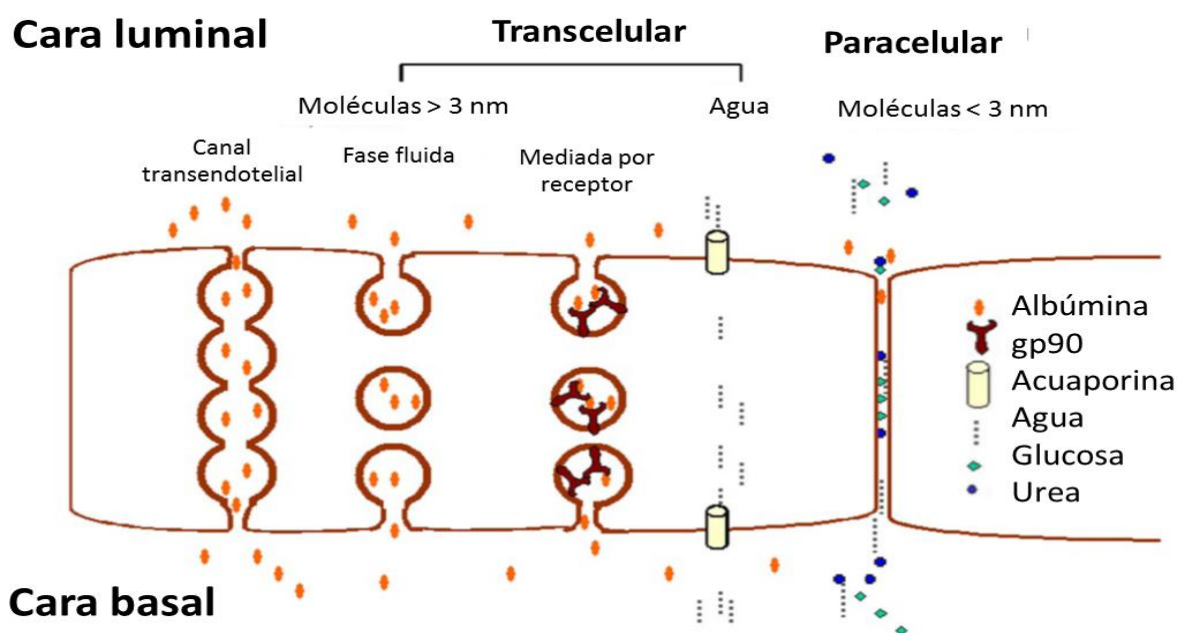


Figura 6. Transporte transcelular y paracelular. Modificado de Mehta y Malik, 2006.

La exclusión selectiva de las proteínas plasmáticas por la barrera endotelial es un factor clave en el establecimiento de gradientes, especialmente en el caso de la albúmina cuyo radio molecular es 3.6 nm. Este gradiente es necesario para el equilibrio de fluidos en los tejidos. Además, las proteínas del plasma, como la albúmina, actúan como chaperonas que permiten la circulación de sustancias hidrofóbicas (como los ácidos grasos y las hormonas), cuyo transporte es crucial para las funciones del organismo. La transferencia de muchas sustancias insolubles, se basa en la permeabilidad del endotelio y en las proteínas transportadoras específicas. El transporte transcelular de macromoléculas puede implicar mecanismos dependientes de receptor (transcitosis mediada por receptor) o independientes de receptor (transcitosis de fase fluida) (Mehta y Malik, 2006) (Fig. 6).

En la actualidad existe un consenso general de que los líquidos y solutos se mueven por difusión pasiva a través de la barrera por la ruta paracelular; mientras que las macromoléculas utilizan una ruta transcelular, transportadas a través de la barrera endotelial en vesículas transportadoras, incluidas las caveolas y los organelos vesículo-vacuolares, y/o pasan a través de canales transendoteliales derivados de vesículas (Mehta y Malik, 2006; Aird, 2007).

Factores que modifican la permeabilidad vascular.

La heterogeneidad espacial de la permeabilidad basal puede ser explicada por la diferencia en las propiedades de las uniones, la presencia o ausencia de fenestras, y/o la actividad diferencial de la maquinaria de transporte. Dos tipos principales de uniones intercelulares influyen en la permeabilidad del endotelio (Aghajanian *et al.*, 2008) (Fig. 7):

Las **uniones estrechas** forman la zona ocluyente: generalmente se encuentran en la región apical de la hendidura intercelular. Están formadas por proteínas transmembranales que contienen dominios extracelulares que interactúan por medio de interacciones homofílicas con las proteínas de células adyacentes (Mehta y Malik, 2006). Las proteínas de la familia de las claudinas son el mayor componente de las uniones estrechas; las 20 proteínas que forman la familia tienen una amplia distribución, aunque la claudina-5 parece ser específica para las células endoteliales. La ocludina fue la primera proteína transmembranal identificada en las uniones estrechas del endotelio y el epitelio, se cree que tiene un papel central en la regulación de la permeabilidad paracelular de los vasos sanguíneos (Aghajanian *et al.*, 2008).

La proteína llamada molécula de adhesión de las uniones (JAM-1), no sólo contribuye a la permeabilidad endotelial participando directamente en la función de barrera, sino que puede actuar como receptor que interactúa con las integrinas de los leucocitos para regular directamente la transmigración (Aghajanian *et al.*, 2008). La heterogeneidad de las uniones de las células endoteliales es un reflejo de la expresión diferencial de isoformas específicas de las moléculas de adhesión. Además de las proteínas transmembranales, hay proteínas que forman un complejo en la cara citoplasmática de las uniones estrechas, incluyendo las ZO-1 y ZO-2. Estas proteínas de andamiaje enlazan los dominios citoplasmáticos de las

proteínas transmembranales con el citoesqueleto de actina (Aghajanian *et al.*, 2008).

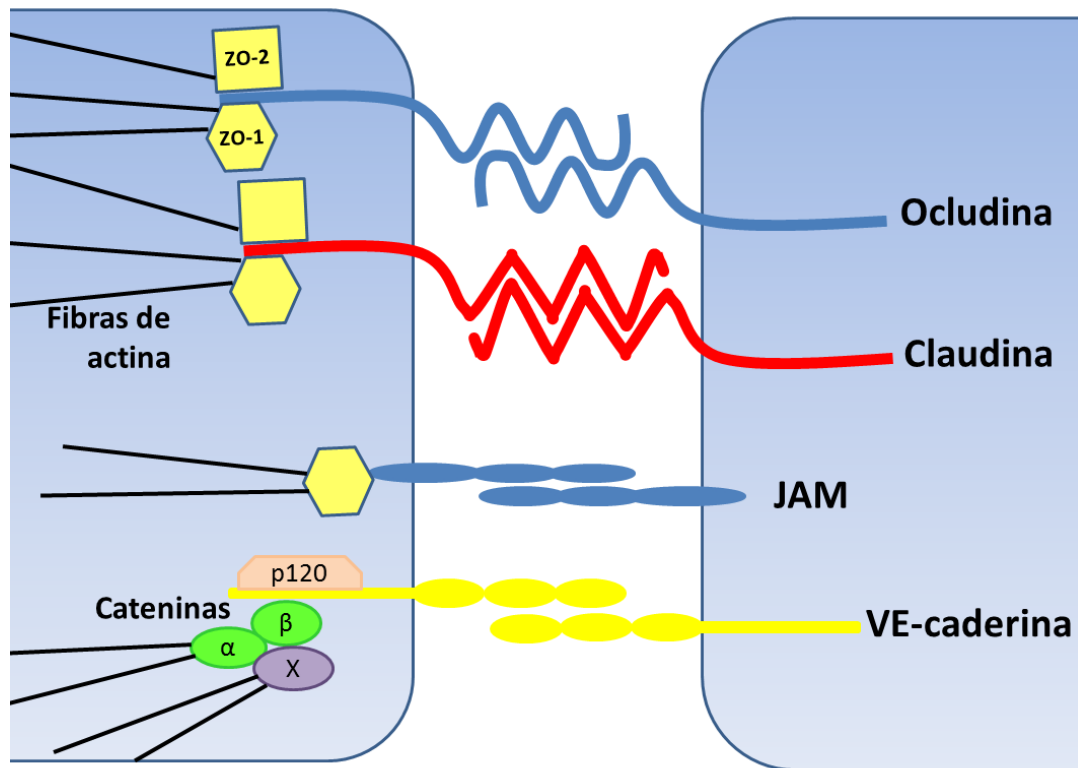


Figura 7. Uniones ocluyentes y adherentes en el endotelio. Las uniones ocluyentes son las formadas por las interacciones homofílicas de las claudinas, ocludinas y JAM-1; estas proteínas se unen al citoesqueleto por medio de proteínas de andamiaje como ZO-1 y ZO-1. Las uniones adherentes son las formadas por las uniones de VE-caderina, que interactúan con el citoesqueleto mediante las cateninas. Modificado de Aghajanian *et al.*, 2008.

Las **uniones adherentes** forman la zona adherente: median una adhesión firme entre las células adyacentes, principalmente por la proteína transmembranal VE-caderina. La región intracelular de VE-caderina se une a las proteínas citoplasmáticas asociadas a las uniones adherentes, particularmente las cateninas alfa, beta y p120. La alfa y beta cateninas son consideradas una unión crucial entre la porción citoplásmica de las caderinas y el citoesqueleto. La catenina p120 es importante para el mantenimiento de la barrera, no por su acción como puente con la actina sino porque regula la actividad del complejo con la caderina, contribuyendo a mantener a la VE-caderina en la membrana (Aghajanian *et al.*, 2008). Al administrar un anticuerpo neutralizante anti VE-caderina se bloquea la función de ésta y se induce la infiltración de neutrófilos en modelos *in vivo* de

peritonitis, además de producir hiper-permeabilidad vascular en el intersticio del pulmón (Mehta y Malik, 2006).

La composición de la unión de las hendiduras intercelulares varía a través del árbol vascular. De hecho, el número y la complejidad de uniones estrechas es inversamente proporcional a la permeabilidad. Las células endoteliales de las grandes arterias, expuestas a altas presiones del flujo sanguíneo, muestran abundantes uniones estrechas. Dentro de la microvasculatura, las uniones son más “estrechas” en las arteriolas en comparación con los capilares y son bastante más laxas en las vénulas postcapilares. Este patrón de las uniones estrechas en las vénulas post-capilares refleja el papel de este tipo de vaso sanguíneo en la mediación de la inflamación, facilitando la extravasación de leucocitos y componentes del plasma. Por el contrario, la barrera hematoencefálica protege el tejido nervioso de las fluctuaciones en la composición de la sangre y es especialmente rica en uniones estrechas (Aird, 2007).

La interacción con el citoesqueleto es necesaria para mantener la integridad del anclaje y reforzar las uniones entre las células endoteliales. Los paquetes corticales de actina, son estructuras que se encuentran en la periferia de las células endoteliales, promueven la estabilidad de las uniones; cuando hay un incremento en la permeabilidad éstas disminuyen y se promueve la formación de fibras de estrés. Se ha propuesto a la tensión isométrica como uno de los principales mecanismos de regulación de la permeabilidad endotelial (Aghajanian *et al.*, 2008; Mehta y Malik, 2006)

Compuestos vasoactivos como la trombina, la histamina y el factor de crecimiento vascular endotelial tipo 1 (VEGF-1), pueden regular las uniones endoteliales por múltiples mecanismos. Alteran la arquitectura de la hendidura endotelial al afectar la expresión de las proteínas de unión, su localización y estabilidad (Aghajanian *et al.*, 2008). Esto ocurre a través de la fosforilación de proteínas, la activación de vías de señalización río abajo, la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la modificación de la actividad de Rho y Rac GTPasas pequeñas que afectan al citoesqueleto (Mehta y Malik, 2006).

Además de la transferencia basal de sustratos a través del lecho capilar, el endotelio es capaz de mediar la permeabilidad inducida en estados de inflamación aguda y crónica. Como ya se ha mencionado, los sitios predominantes de

permeabilidad inducida son las vénulas postcapilares. Hay dos propuestas sobre cómo es que algunos agonistas, como la histamina, serotonina, bradiquinina, sustancia P y VEGF-1, aumentan la permeabilidad; la primera, es que inducen la retracción de las células endoteliales y la formación de huecos intercelulares; la segunda es que incrementan el transporte transcelular de las macromoléculas (Aird, 2007).

La predilección por las vénulas postcapilares como sitio para la permeabilidad inducible puede ser explicada por la relativa abundancia de organelos vacuolares vesiculares, la escasez de uniones estrechas (menos contactos intercelulares) y la expresión preferencial de receptores de bradiquinina, histamina y serotonina. Sin embargo, la inflamación causa disfunción en cualquier lugar del árbol vascular, incluyendo venas, arteriolas, y capilares (Aird, 2007) (Fig. 8).

Endotelio e inflamación

El reconocimiento de patógenos y el daño tisular inician una respuesta inflamatoria. Durante el proceso inflamatorio se reclutan efectores moleculares y células hacia el sitio de la infección; las células endoteliales juegan un papel clave en el proceso de inflamación, ya que regulan la extravasación de las células del sistema inmune (Abbas *et al.* 2010).

La **activación de las células endoteliales** por el daño tisular o las citocinas liberadas por los leucocitos, estimula la producción de sustancias que actúan como vasodilatadores, como la prostaciclina (PGI₂) y óxido nítrico (NO); estos, causan un incremento en el flujo sanguíneo local y una disminución de su velocidad, optimizando la llegada de leucocitos al sitio de la inflamación (Janeway, 2008). El TNF- α secretado por los leucocitos incrementa la expresión y actividad de la enzimas endoteliales que sintetizan prostaciclina y, junto con la acción del IFN- γ , la síntesis de óxido nítrico. Además, la activación de células endoteliales incrementa la expresión de proteínas de superficie, haciendo que sean adhesivas para los leucocitos (Abbas *et al.*, 2010).

La E y la P selectinas son las primeras moléculas de adhesión en aparecer, se expresan una o dos horas después del inicio del proceso inflamatorio. La E-selectina está presente sólo en células endoteliales activadas; su expresión se

limita principalmente a las vénulas postcapilares, donde inicia el contacto con los leucocitos, en su mayoría neutrófilos. La P-selectina se localiza en megacariocitos y células endoteliales; en el endotelio no activado la P-selectina se encuentra almacenada en los cuerpos de Weibel-Palade y se expresa preferencialmente en vénulas postcapilares. A las 24 h de inducción la expresión de P-selectina se mantiene, mientras que los niveles de E-selectina regresan a su nivel basal (Aird, 2007).

A diferencia de las selectinas P y E, ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1) y VCAM-1 (molécula de adhesión de células vasculares 1) se encuentran en muchos tipos celulares, vasculares y no vasculares. La expresión constitutiva de VCAM-1 en la superficie de la membrana apical de las células endoteliales, es generalmente menor que la de ICAM-1. Después del estímulo inflamatorio tardan cerca de 6 h en aparecer en la superficie celular. La diferencia en el tiempo de expresión de las selectinas E y P con respecto a VCAM-1 e ICAM-1 produce un reclutamiento diferencial de leucocitos, ya que durante las primeras 6 h se reclutan principalmente neutrófilos y después son reclutados más linfocitos y monocitos. (Aird, 2007)

Extravasación de leucocitos

La regulación de la migración trans-endotelial (TEM) de los leucocitos es esencial en la respuesta inflamatoria. La TEM de los leucocitos puede ocurrir por dos diferentes rutas, paracelular y transcelular; *in vivo* la prevalente es la paracelular, que requiere la interrupción transitoria de las uniones para que los leucocitos puedan atravesar el endotelio, probablemente por la formación de un poro (Aghajanian *et al.*, 2008).

El paso de leucocitos de la sangre a los tejidos subyacentes implica varios pasos de una cascada de adhesión: unión inicial, rodamiento, arresto y transmigración. Estos pasos se realizan casi exclusivamente en las vénulas postcapilares (Abbas *et al.*, 2010).

Con el endotelio activado, los encuentros al azar entre los leucocitos circulantes y las células endoteliales aumentan; incrementando el tiempo que los leucocitos pasan en la superficie del endotelio vascular. El contacto inicial se da por las interacciones entre los ligandos de carbohidratos de los leucocitos y las

selectinas E y P de las células endoteliales, de igual forma la selectina L de los leucocitos se une a los ligandos de carbohidratos de las células endoteliales, como el ácido sialil-Lewis. En la microvasculatura la fuerza del flujo sanguíneo empuja a los leucocitos, causando una disrupción de las interacciones de las selectinas; estas interacciones se forman nuevamente río abajo cuando el leucocito se mueve. El resultado es el rodamiento de los leucocitos a través de la superficie de las células endoteliales (Barreiro y Sánchez-Madrid, 2009).

Los leucocitos que están en rodamiento se activan, las señales de activación son las quimiocinas del tipo C-X-C para los neutrófilos y del tipo C-C para otros leucocitos. Esas quimiocinas están unidas al grupo de proteoglicanos en la superficie de las células endoteliales, pueden ser sintetizadas por el endotelio o generadas por los leucocitos que ya están en el tejido. Los leucocitos activados rearrreglan su citoesqueleto y cambian de forma, de alargados a planos. Además hay un cambio conformacional que incrementa la afinidad de sus integrinas por los ligandos de las células endoteliales (Rao *et al.*, 2007).

Los leucocitos activados se unen firmemente a las células endoteliales, mediante integrinas de alta afinidad; los neutrófilos y monocitos utilizan las integrinas LFA-1 (antígeno asociado a la función de los linfocitos 1) y Mac-1 (antígeno de macrófago 1) para unirse a las integrinas endoteliales ICAM-1, ICAM-2 y JAM; en todos los leucocitos, a excepción de los neutrófilos, la integrina VLA-4 (antígeno muy tardío 4) se une a VCAM-1. Los leucocitos que están arrestados ya no tienen rodamiento, pero se van moviendo lentamente hasta llegar a las uniones inter-endoteliales (Rao *et al.*, 2007). Ahí, reciben señales adicionales que desencadenan la transmigración a través de la hendidura recién formada. Las bases moleculares de la transmigración no se conocen del todo, pero se cree que implican a las moléculas de adhesión CD99 y PECAM-1/CD31 (molécula de adhesión plaqueta-endotelial) presentes en células endoteliales y leucocitos; así como a JAM-1 expresada en células endoteliales y cuyos ligandos son LFA-1, Mac-1 y VLA-4. Una vez en el tejido los leucocitos se mueven por el gradiente de quimiocinas (Aird, 2007).

Aunque las interacciones leucocito-endotelio son observadas generalmente en las vénulas postcapilares, pueden ocurrir en cualquier segmento del árbol vascular, incluidas las venas, los capilares y las arteriolas. Por esto, los pasos de la cascada no aplican a todos los lechos vasculares; por ejemplo, en los pulmones y en

el hígado los leucocitos se adhieren al endotelio independientemente del rodamiento, los neutrófilos reclutados en estos segmentos vasculares no necesitan selectina P o E pero son parcialmente dependientes de ICAM-1 (Aird, 2007) (Fig. 8).

Otro tipo de tráfico de leucocitos se lleva a cabo en los órganos linfoides secundarios. Ahí transmigran a través de vénulas postcapilares especializadas, llamadas vénulas endoteliales altas (HEV); las HEV tienen un tráfico constitutivo de linfocitos entre la sangre y los nodos linfáticos, en contraste con las vénulas postcapilares no linfoides, que tienen trans migración de leucocitos sólo durante la inflamación (cuando se activan). El endotelio venular alto expresa moléculas de adhesión únicas; ejemplo de esto es la adreína de nódulo linfático periférico (PNAd) expresada constitutivamente, es uno de los ligandos de la L-selectina (Krüger y Mooren 2007). De esta forma se inicia el proceso de adhesión necesario para el rodamiento. La activación de las integrinas de los leucocitos también es mediada por quimiocinas constitutivas de las HEV (Aird, 2007) (Fig.8).

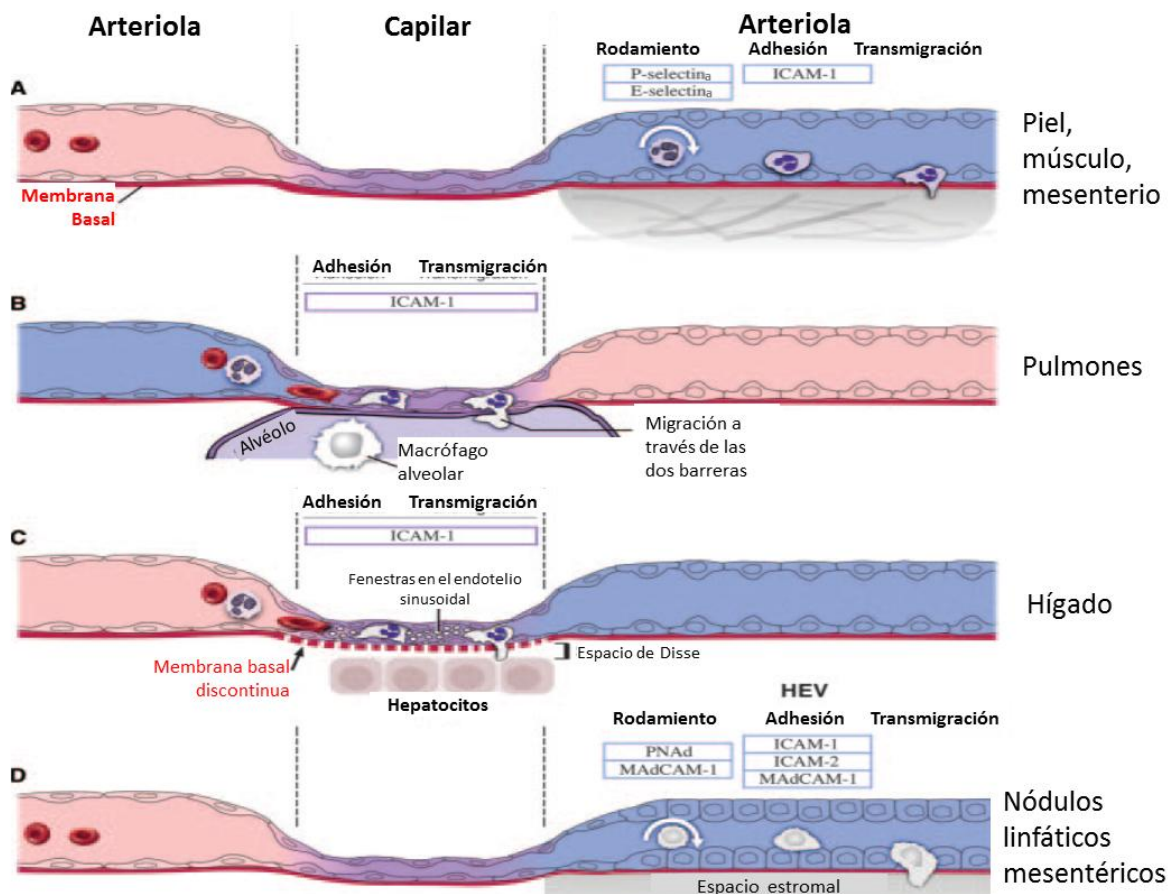


Figura 8. Diferentes lechos vasculares y tráfico de leucocitos. Las moléculas de adhesión expresadas en cada lecho vascular se muestran en los recuadros. Modificado de Aird, 2007.

Aunque la extravasación de los leucocitos es necesaria para la respuesta inflamatoria, cuando es excesiva o en un lugar inapropiado, puede iniciar procesos patológicos (Aghajanian *et al.*, 2008); ejemplo de esto, son la artritis, la aterosclerosis o el síndrome de Crohn, etc.

Inflamación y metástasis

Se ha relacionado a la inflamación crónica con la progresión del cáncer; especialmente el cáncer de colon con el proceso inflamatorio del síndrome de Crohn, algunas formas de hepatocarcinoma con la infección por los virus de la hepatitis, linfomas con el virus Epstein Barr, y el cáncer de estómago con la infección con *Helicobacter pylori*. Desde 1863 se documentó la presencia de leucocitos en lesiones neoplásicas en tejidos con inflamación crónica (Coussens y Werb, 2002; Le-Bitoux y Stamenkovic, 2008). Se creía que la presencia de células del sistema inmune era para contender con las células tumorales; sin embargo, se ha demostrado que la presencia de leucocitos puede acelerar la progresión del cáncer (Joyce y Pollard, 2009).

La inflamación puede estimular o inhibir el desarrollo del tumor, dependiendo de la composición del infiltrado. La infiltración de células T CD8⁺ y células dendríticas maduras está asociada con un pronóstico favorable en el cáncer colorrectal y el de cabeza y cuello (Joyce y Pollard, 2009). Sin embargo, la infiltración de macrófagos se asocia con un mal pronóstico en más del 80% de los tipos de cáncer analizados, incluido el de mama, y se ha correlacionado el infiltrado de macrófagos con la metástasis (Joyce y Pollard, 2009; Calorini y Bianchini, 2010).

No se ha definido qué tipo celular se infiltra primero durante el proceso de metástasis, las células tumorales o las del sistema inmune; pero una vez que alguno ha llegado, la liberación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento aumenta la probabilidad de que el otro sea reclutado (Maru, 2007).

Durante el proceso de extravasación, necesario en la metástasis, las células tumorales deben interactuar con las células endoteliales. Debido a que el endotelio se encarga de regular la permeabilidad vascular y la migración trans-endotelial de las células del sistema inmune, se ha propuesto que para extravasarse las células cancerosas utilizan un proceso similar al utilizado por las células del sistema inmune; lo cual implica una activación de las células del endotelio, arresto de

células tumorales sobre el endotelio vascular y su migración a través de los espacios inter-endoteliales recién formados, migración paracelular (Gupta *et al.*, 2006). Un incremento en la permeabilidad endotelial podría acelerar el proceso metastásico mediante la facilitación de la transmigración de células cancerosas a través de la barrera endotelial.

El proceso de la extravasación de las células cancerosas parece ser similar al de los leucocitos. La presencia de células cancerosas en el endotelio puede aumentar la expresión de moléculas de adhesión, incrementar la proteína cinasa activada por el estrés-2 (SAPK2/p38) e inducir la polimerización de la actina y la reorganización de fibras de estrés en las células endoteliales. Estos procesos pueden permitir la transmigración paracelular a través de la formación de "agujeros" en la monocapa endotelial (Brábek *et al.* 2010).

Estado premetastásico

Se ha demostrado que algunas líneas celulares de cáncer pueden inducir al endotelio a un estado pre-metastásico a distancia, ya que liberan factores solubles capaces de activar al endotelio (Perelmuter *et al.*, 2012; Estrada *et al.*, 2003a). De esta manera, la interacción entre el endotelio y las células metastásicas no se limitaría a un contacto físico célula-célula.

Los cambios tempranos observados en los tejidos, antes de la evidencia de carcinogénesis (respuesta inflamatoria, remodelación de la matriz, incrementos de las especies reactivas de oxígeno y otras moléculas bioactivas) sugieren que los cambios en el microambiente del tejido pueden ser un componente crítico de la metástasis tejido específica; en general, estos cambios están relacionados con la activación del endotelio y células del sistema inmune durante el proceso de inflamatorio (Coussens y Werb, 2002). Un microambiente inflamatorio, con el endotelio activado, promovería el reclutamiento celular, tanto de leucocitos como de células tumorales. La presencia de ambos tipos celulares favorece la proliferación de las células metastásicas (Maru, 2007).

La creación de un nicho premetastásico, mediante la desestabilización del endotelio pulmonar y el aumento en su permeabilidad, ha sido utilizado como modelo de metástasis preferencial *in vivo* (Orr *et al.*, 1986; Huang *et al.*, 2009).

Distintos tipos de cáncer presentan patrones diferentes de metástasis hacia órganos preferenciales (Fig. 9), ejemplo de esto es que las células de cáncer de mama tienden a infiltrarse y colonizar en huesos, pulmones, hígado y cerebro. El mecanismo parece ser dependiente de citocinas, del mismo modo que la migración de diferentes subtipos de leucocitos (Nguyen *et al.*, 2009).

Tipo de cáncer	Principales sitios de metástasis
Mama	Hueso, pulmón, hígado y cerebro
Adenocarcinoma de pulmón	Cerebro, hueso, suprarrenales e hígado
Melanoma	Pulmón, cerebro, piel e hígado
Colorrectal	Hígado y pulmón
Pancreático	Hígado y pulmón
Próstata	Hueso
Sarcoma	Pulmón

Figura 9. Principales blancos de metástasis en diferentes tipos de cáncer. Tomado de Nguyen *et al.*, 2009

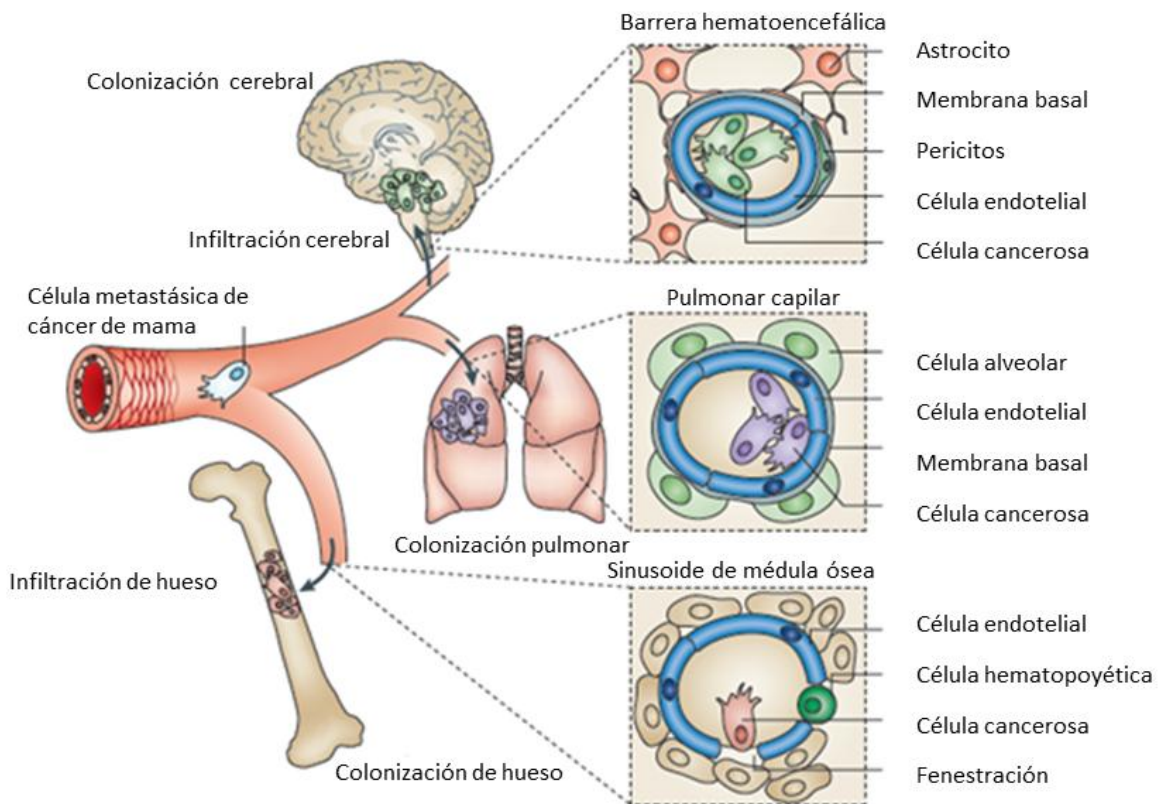


Figura 10. Principales blancos de metástasis en cáncer de mama. Se muestra la interacción de las células metastásicas con el endotelio. Tomado de Nguyen *et al.*, 2009.

La metástasis hacia órganos preferenciales puede deberse a citocinas, quimiocinas y proteasas específicas, liberadas al torrente sanguíneo por los

tumores primarios. La expresión diferencial de estos factores favorece la predisposición para extravasarse en órganos diferentes; así mismo, el tipo de endotelio del tejido blanco juega un papel importante (Fig. 10), ya que un endotelio adaptado a una migración activa de precursores de macrófagos, bajo un contexto de inflamación, puede ser más susceptible al arresto de las células metastásicas (Perelmuter *et al.*, 2012).

La activación del endotelio, que provoca un incremento en la permeabilidad, de los órganos blanco es necesaria para el desarrollo de un microambiente permisivo para el arresto de las células tumorales, lo cual es esencial para la metástasis (Eum *et al.*, 2004).

ANTECEDENTES

Efecto de los factores solubles tumorales en la activación de células endoteliales *in vitro*

En trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio, se demostró que los productos secretados por células de linfomas de Hodgkin son capaces de activar al endotelio. Al usar inhibidores específicos de la vía de NF- κ B y aspirina, que también inhibe la activación de la vía de NF- κ B, se abatió la respuesta de adhesión (Estrada-Bernal *et al.*, 2003 a y b). También se estudió el efecto de productos liberados por líneas celulares de cáncer de mama, utilizando cultivos de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC); se observó la activación del endotelio, la expresión de moléculas de adhesión (Fig. 11), que esta activación era mediada por la vía de NF- κ B (Montes-Sánchez *et al.*, 2009).

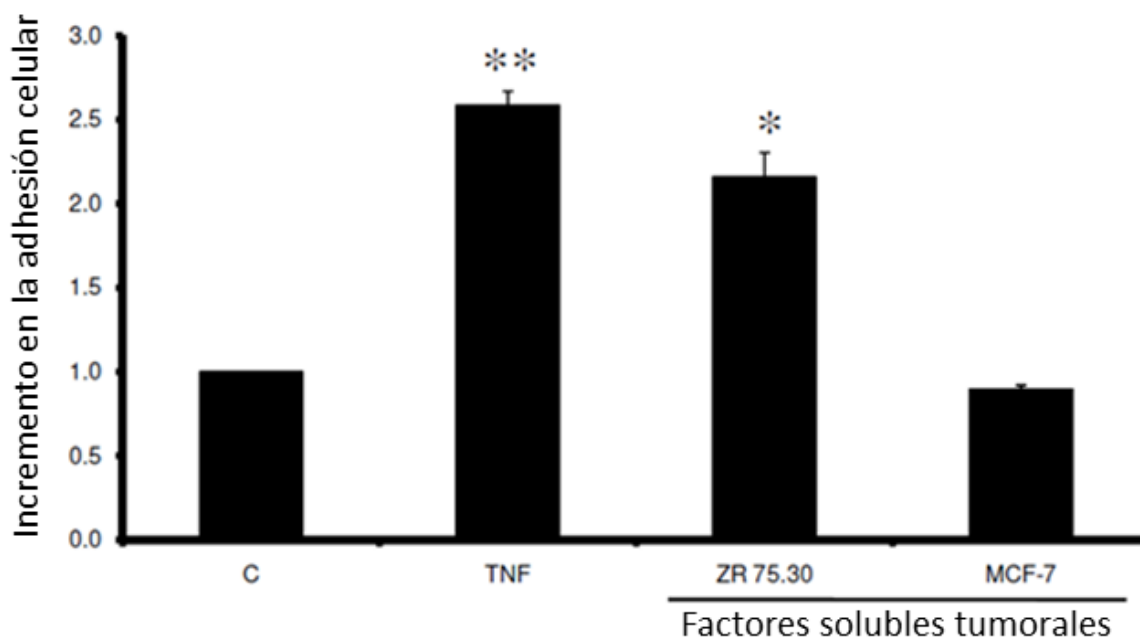


Figura 11. La adhesión de células U937 a los cultivos de HUVEC tratados con los factores solubles tumorales de las líneas de cáncer de mama ZR75-30 y MCF-7, es un reflejo del aumento de las moléculas de adhesión al activarse las células endoteliales. Tomado de Montes-Sánchez *et al.*, 2009.

Entre las citocinas y quimiocinas más abundantes en el medio condicionado de la línea celular de cáncer de mama de alto potencial metastásico ZR75-30, aislada de un carcinoma ductal invasivo, se encuentran las interleucinas 6 y 8 (IL6 y IL8), el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), la proteína quimiotrayente de monocitos 1 (MCP-1) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-1) (Fig. 12). En cambio en la línea MCF-7, de bajo

potencial metastásico, los componentes analizados más abundantes son GM-CSF y VEGF-1, pero presentes en cantidades 3 y 10 veces menores al compararlas con la línea ZR75-30 (Montes-Sánchez *et al.*, 2009) (Fig. 12). Hasta el momento todos los ensayos realizados han sido *in vitro* pues no se cuenta con un modelo adecuado para cuantificar la permeabilidad vascular generada por factores solubles tumorales (FST) *in vivo*.

Elemento analizado	RANGO DE DETECCIÓN			
	TSFZR75.30 (pg/μl)	TSMCF-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	> 33053	< 2.0	33053	2.0
IL-8	> 24800	< 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	> 28728	< 1.7	28728	1.7
MCP-1	> 27978	< 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

Figura 12. Componentes del medio condicionado de las líneas celulares ZR75-30 y MCF-7. Tomado de Montes-Sánchez, 2010.

Técnicas para medir la permeabilidad vascular *in vivo*

Existen varias técnicas para determinar la permeabilidad vascular *in vivo*; algunas de ellas se basan en la producción de edemas pulmonares por los tratamientos a probar, cuantificando la relación del peso hidratado/deshidratado, para estimar el contenido de agua extravasada de la vasculatura pulmonar. Otra técnica de

cuantificación de edemas utiliza albúmina unida a Azul de Evans (Fig. 13); el colorante tiene una alta afinidad por la albúmina, por lo que se utiliza como marcador del paso de ésta a través del endotelio pulmonar. Sin embargo, estas técnicas sólo permiten probar un tratamiento con efecto sistémico (García *et al.*, 2011).

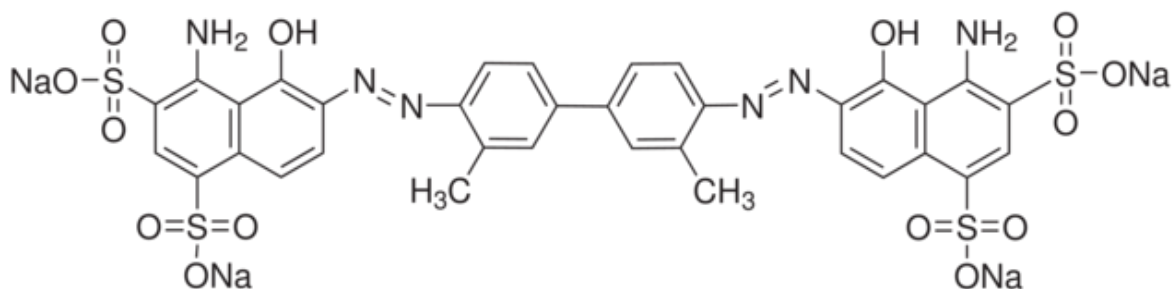


Figura 13. Fórmula del Azul de Evans.

Una de las técnicas usadas para analizar la permeabilidad vascular *in vivo* es la administración de VEGF-1 para generar permeabilidad vascular sistémica, se ha probado su efecto en tratamientos agudos y crónicos. Después de administrarlo, los tejidos se pueden procesar por diferentes técnicas, como inmunohistoquímica, inmunoprecipitación y microscopía electrónica. El tratamiento sistémico con VEGF-1 permite usarlo como control de permeabilidad vascular, pero en un animal diferente (Weiss, 2011).

Otra técnica utilizada para evaluar la permeabilidad vascular *in vivo*, es el ensayo diseñado por Miles y Miles en 1952. En este caso se inyecta un agente proinflamatorio en la piel y se administra un colorante vía intravenosa para monitorear la permeabilidad. Originalmente sólo se medía el diámetro de la marca del colorante o el grosor de la oreja; desde la década de los 90, se extrae el colorante extravasado en la piel y se cuantifica por espectrofotometría (Teshima *et al.*, 1998). El ensayo de Miles tiene la ventaja de que puede probarse más de un tratamiento en el mismo animal, porque el efecto de los agentes es localizado. Durante las últimas décadas se han registrado múltiples variantes de este ensayo (Fig. 14), las cuales incluyen:

- a) El agente a probar: se ha utilizado histamina (Miles y Miles, 1952), sobrenadantes de cultivos celulares (Sobel *et al.*, 1977), sueros de animales inmunizados y anticuerpos monoclonales (Teshima *et al.*, 1998), VEGF-1 (Mamluk *et al.*, 2005), etc.

Principales técnicas para cuantificar permeabilidad vascular *in vivo*

Técnica	Generalidades	Órgano a analizar	Vía de administración	Condiciones por animal	Efecto	Tiempo de incubación
Relación del peso hidratado/deshidratado (I)	Determina la proporción entre el peso del pulmón hidratado y deshidratado, la formación de un edema.	Pulmones	Intravenosa	1	Sistémico	No definido
Permeabilidad a albúmina marcada con azul de Evans (II)	El azul de Evans tiene una alta afinidad por la albúmina, si hay permeabilidad el colorante pasará junto con la albúmina. Se extrae con formamida y se cuantifica.	Pulmones y corazón	Intravenosa	1	Sistémico	2 h
Inducción de permeabilidad sistémica con VEGF (II)	Después del tratamiento con VEGF, las muestras de esta técnica pueden analizarse por inmunohistoquímica, inmunoprecipitación y microscopía electrónica.	Cualquiera	Intravenosa	1	Sistémico	Inmediato, 2 h
Técnica de Miles (Variantes) (III-VI)	La permeabilidad inducida por los tratamientos es cuantificada por la extravasación del azul de Evans en la piel de los ratones.	Piel/oreja	Intradérmica	1-4	Localizado	18-24 h
		Piel	Subcutáneo	2	Localizado	30 min
		Piel	Intradérmica	4	Localizado	30 min

I Tomado de García *et al.*, 2011. II Tomado de Weiss *et al.*, 2011. III Tomado de Miles y Miles, 1952. IV Tomado de Teshima *et al.*, 1998. V Tomado de Petreaca *et al.*, 2007. VI Tomado de Mamluk *et al.*, 2005.

Figura 14. Técnicas de cuantificación de permeabilidad vascular *in vivo*.

- b) El área a inyectar: oreja o dorso.
- c) La profundidad de la inyección: subdérmica o intradérmica.
- d) El periodo de exposición al tratamiento: de 1 min a un día, dependiendo del agente a probar.
- e) La molécula con la que se evalúa la permeabilidad: diazo-derivados marcados radiactivamente, en desuso (Moore y Tobin, 1942); colorantes diazoicos, como azul de Evans, azul de tripano, etc (Miles y Miles, 1952; Fox, 1962); colorantes derivados de cianinas, como el verde de indocianina (Jacob *et al.*, 2007).
- f) El agente usado en la extracción del colorante (en caso se usarse): sulfato de sodio/acetona (Teshima *et al.*, 1998), formamida (Mamluk *et al.*, 2005; Ali *et al.*, 2004; Vennekens *et al.*, 2007), etc.
- g) La temperatura y el tiempo de extracción: desde 5 días a temperatura ambiente (Mamluk *et al.*, 2005) , 48 h a 55 °C (Vennekens *et al.*, 2007) hasta 24 h a 65 °C (Ali *et al.*, 2004)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento de la permeabilidad vascular podría acelerar el proceso metastásico mediante la facilitación de la transmigración de células cancerosas a través de la barrera endotelial. Se ha demostrado que algunas líneas celulares de cáncer pueden inducir al endotelio a un estado pre-metastásico a distancia, ya que liberan factores solubles capaces de actuar en órganos blanco distantes. Sin embargo, no se ha estudiado cuál es el efecto de los medios condicionados de líneas celulares de cáncer de mama sobre la permeabilidad vascular *in vivo*, ya que no se cuenta con un modelo animal adecuado.

Si bien, existen modelos de permeabilidad *in vitro*, al ser en cultivos primarios no poseen las interacciones con otras estirpes celulares, como las células del sistema inmune. La estandarización de un ensayo de permeabilidad vascular *in vivo* que sea sensible a factores solubles tumorales, permitiría obtener un modelo animal para estudiar las interacciones entre el endotelio, células del sistema inmune y cancerosas durante el proceso de metástasis; así como determinar si hay una relación entre el potencial metastásico de diferentes líneas celulares y su habilidad para aumentar la permeabilidad vascular.

HIPÓTESIS

Los productos secretados por la línea celular de cáncer de mama ZR75-30 son capaces de modificar la permeabilidad de las células endoteliales *in vivo* y este efecto puede cuantificarse mediante un ensayo de permeabilidad vascular en piel.

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar un ensayo de permeabilidad vascular *in vivo* en piel que permita analizar el efecto de los factores solubles tumorales (FST) de la línea celular de cáncer de mama ZR75-30.

Objetivos particulares

1. Montaje de la técnica de permeabilidad *in vivo* sensible a los FST de la línea celular ZR75-30.
2. Identificar si los medios condicionados de línea de cáncer de mama ZR75-30 son capaces de modificar la permeabilidad vascular en un modelo *in vivo*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Condiciones de cultivo celular

Células ZR75-30. Las células de esta línea de cáncer de mama se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico y antimicótico al 1%; a 37°C con humedad relativa del 100% y 5% CO₂.

Obtención de factores solubles secretados por las células tumorales

Las células de la línea de cáncer de mama se sembraron en platos de cultivo de 100 mm de diámetro. Cuando las células alcanzaron 100% de confluencia, la monocapa formada se lavó 10 veces con 10 ml de PBS suplementado con CaCl₂ (3 mM) y MgCl₂ (5 mM) para remover los componentes del suero, sin desprender las células. Posteriormente, las células se incubaron con 10 ml de medio sin suero y sin rojo de fenol. Se incubaron 48 h, se colectó el medio y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo o directamente a un frasco de liofilizado. Se congelaron las muestras y se liofilizaron entre 24 y 48 h. El polvo resultante se resuspendió en agua, en una décima parte del volumen original. Se centrifugó a 5,000 rpm durante 60 min a 4°C.

A este concentrado se le realizaron 2 procesos de diálisis, cada una de 24 horas, con una membrana de ultrafiltración de poros de 10 kDa, contra una solución de PBS, pH 7, con el fin de que se recuperé el equilibrio osmótico del medio condicionado. La solución obtenida se centrifugó a 5,000 rpm durante 60 min a 4 °C, se pasó por un filtro de 0.22 µm y se almacenó a 4°C hasta su uso. (Fig. 15) El contenido en proteínas se determinó al cuantificar mediante el reactivo de Bradford.

Se encontraron 15.77 ng/µl de proteína total en los medios condicionado de la línea celular ZR75-30, mientras que en el medio sin contacto con células no se encontró proteína al cuantificar por el método de Bradford (Fig. 16).

Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE)

Se mezclaron 650 ng de proteína total de los FST de la línea celular ZR75-30 con el amortiguador Laemmli, la mezcla se sometió a ebullición durante 5 min, en el baño

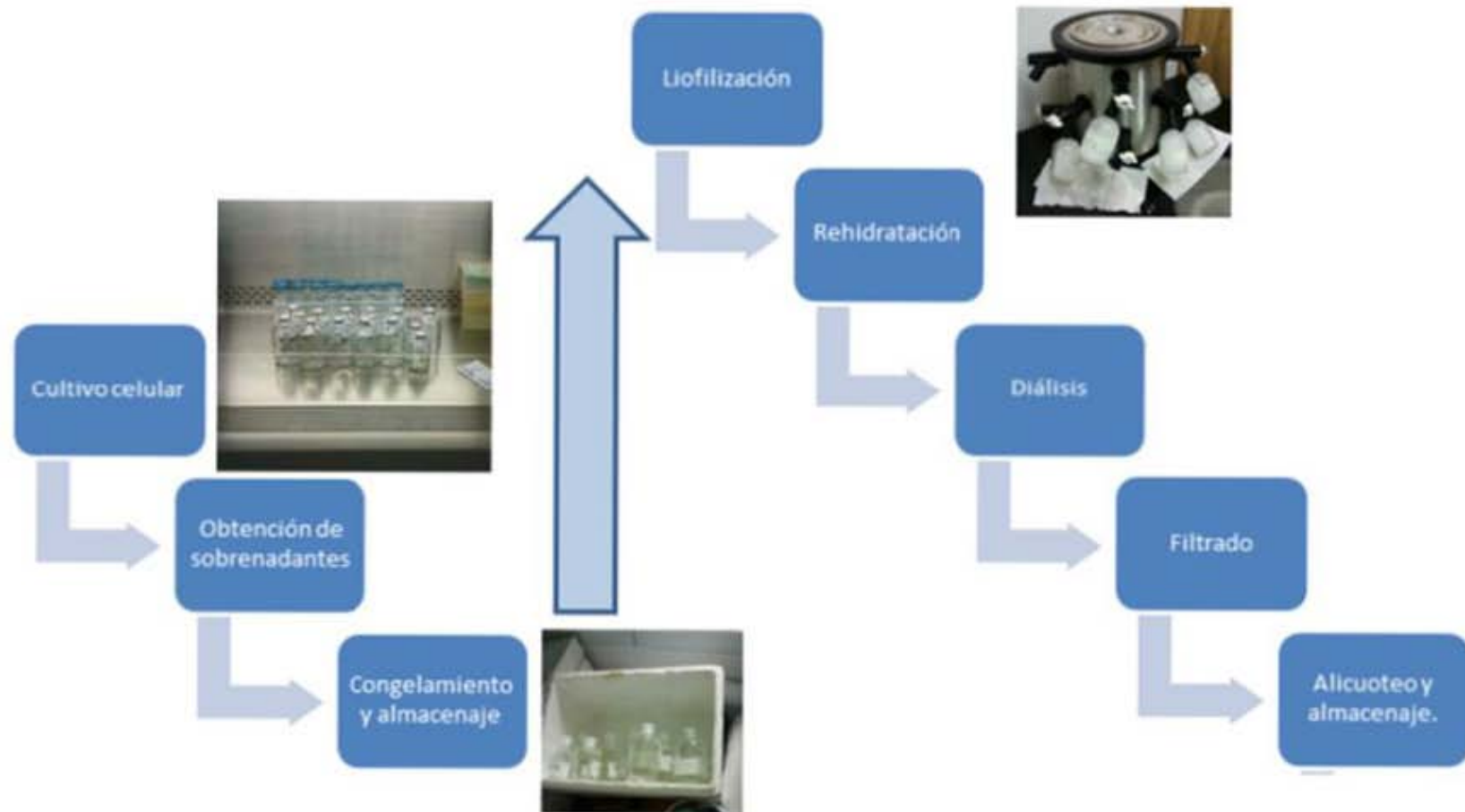


Figura 15. Procedimiento de obtención de medios condicionados.

maría, luego se colocó en hielo por 5 min. Se cargó la muestra en un microgel, con un concentrador de acrilamida al 4% y un separador al 10% de acrilamida. Se corrió a 80 V durante 15 min y se aumentó el voltaje a 100 V, hasta obtener la separación adecuada, utilizando al marcador de peso molecular como guía.

Proteína total en medios condicionados

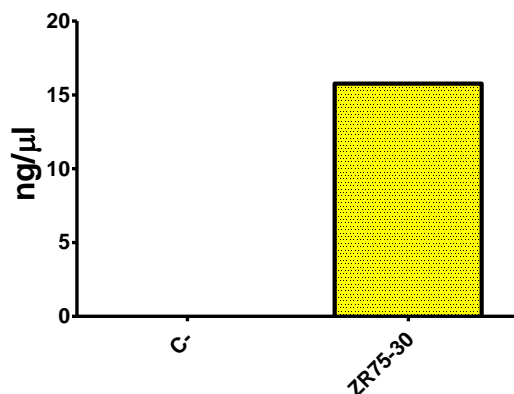


Figura 16. Cuantificación de proteína total en los medios condicionados de las células ZR75-30 y el medio sin contacto con las células, utilizando el método de Bradford.

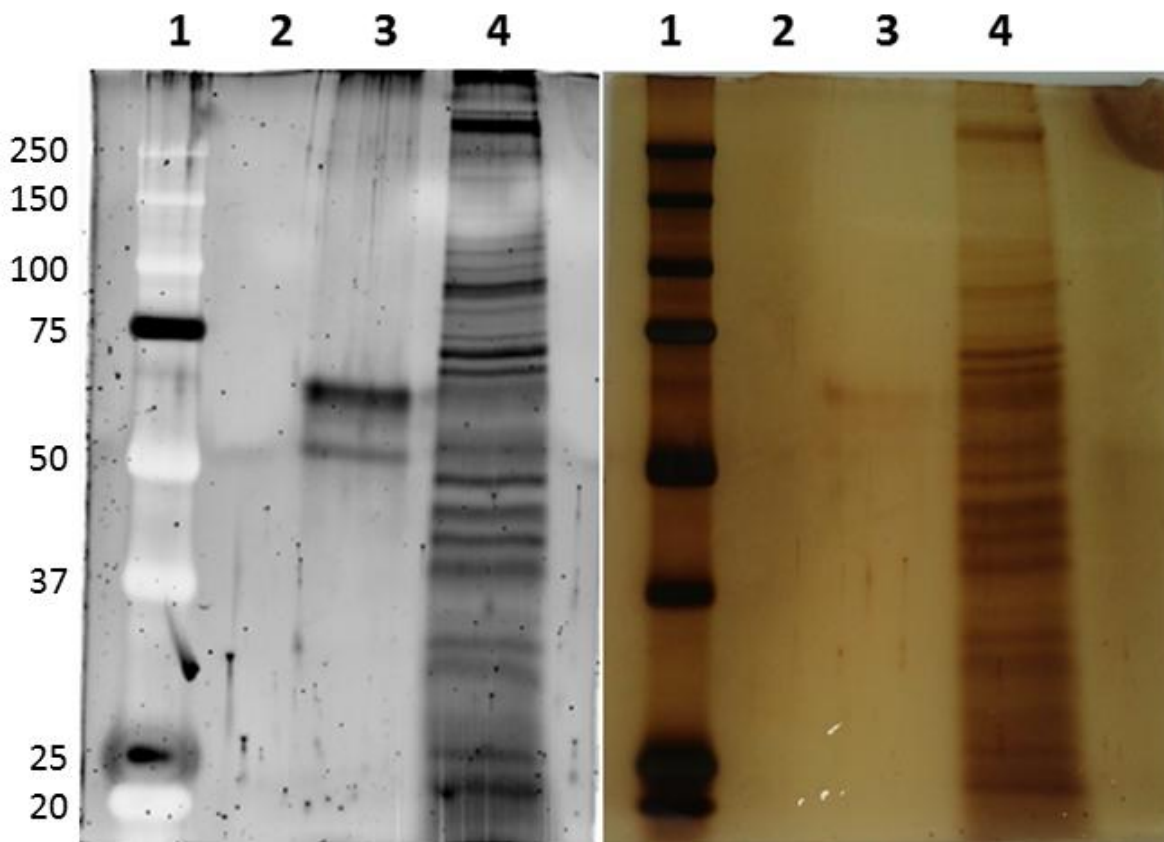


Figura 17. Tinción con Deep Purple (izquierda) y nitrato de plata (derecha); en ambos: carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 vacío, carril 3 medio condicionado sin contacto con células, carril 4 medio condicionado de la línea ZR75-30.

Para la visualización de las proteínas separadas, el gel fue teñido con Deep Purple y con nitrato de plata (Fig.17). Para la tinción de plata el gel se fijó con ácido tricloroacético al 20% toda la noche. Se realizaron dos lavados con solución de fijación (40% de metanol y 10 de ácido acético), se dejó en agitación constante por 20 min. Se lavó dos veces el gel, con abundante agua, en agitación por 20 min. Se incubó con una solución de glutaraldehído a 10% por 30 min. Se lavó 3 veces con agua, cada lavado de 20 min. Se incubó con la solución de plata por 30 min. Se dieron 3 lavados de 5 min con agua. Se agregó la solución de revelado hasta que las bandas fueron definidas y se agregó la solución de paro.

Para la tinción con Deep Purple se fijó con una solución de 7.5% de ácido acético y 10% de metanol, durante toda la noche. Se lavó con agua desionizada por 30 min. Se agregó la solución de Deep Purple y se incubó durante una hora en oscuridad. Se realizaron 4 lavados (30 min cada uno) con ácido acético al 7%. Se escaneó en el escáner Typhoon; utilizado la aplicación Fluorescente Laser Green 532, con 600 y 100 micrómetros de profundidad.

Ensayos de permeabilidad *in vivo*

Se utilizaron ratones machos de la cepa Swiss Webster de 8 semanas, de entre 25 y 30 g de peso. Los animales se anestesiaron, vía intraperitoneal, con una mezcla de ketamina (94 mg/kg) y xilacina (5.66 mg/kg), y se rasuraron del dorso. Se inyectaron 7 µl de inmunoglobulina E (280 ng totales) en la oreja, como control positivo de la reacción y se dejaron actuar de 18 a 24 horas. 180, 300 y 600 ng de IgE se inyectaron, independientemente, en el dorso (intradérmicamente y subdérmicamente), con un periodo de incubación de 18 a 24 horas. Posteriormente se inyectaron, vía la vena caudal, 100 µl de Azul de Evans (0.5% en agua) y 100 ng del antígeno dinitrofenol (DNP).¹

Para probar el efecto de los FST y del VEGF-1 en un periodo de incubación corto, se realizaron inyecciones a 15 min después de administrar el Azul de Evans. Los ratones se anestesiaron y se inyectaron (sub e intradérmicamente) en la piel del dorso, con los controles positivos y medios condicionados a probar: 5, 10, 25,

¹ Las variantes del ensayo de Miles se realizaron en la sede sur del CINVESTAV del IPN, en el laboratorio de la Dra. Claudia González Espinosa, en el departamento de Farmacobiología; con la ayuda técnica del Maestro en Ciencias Alfredo Ibarra Sánchez

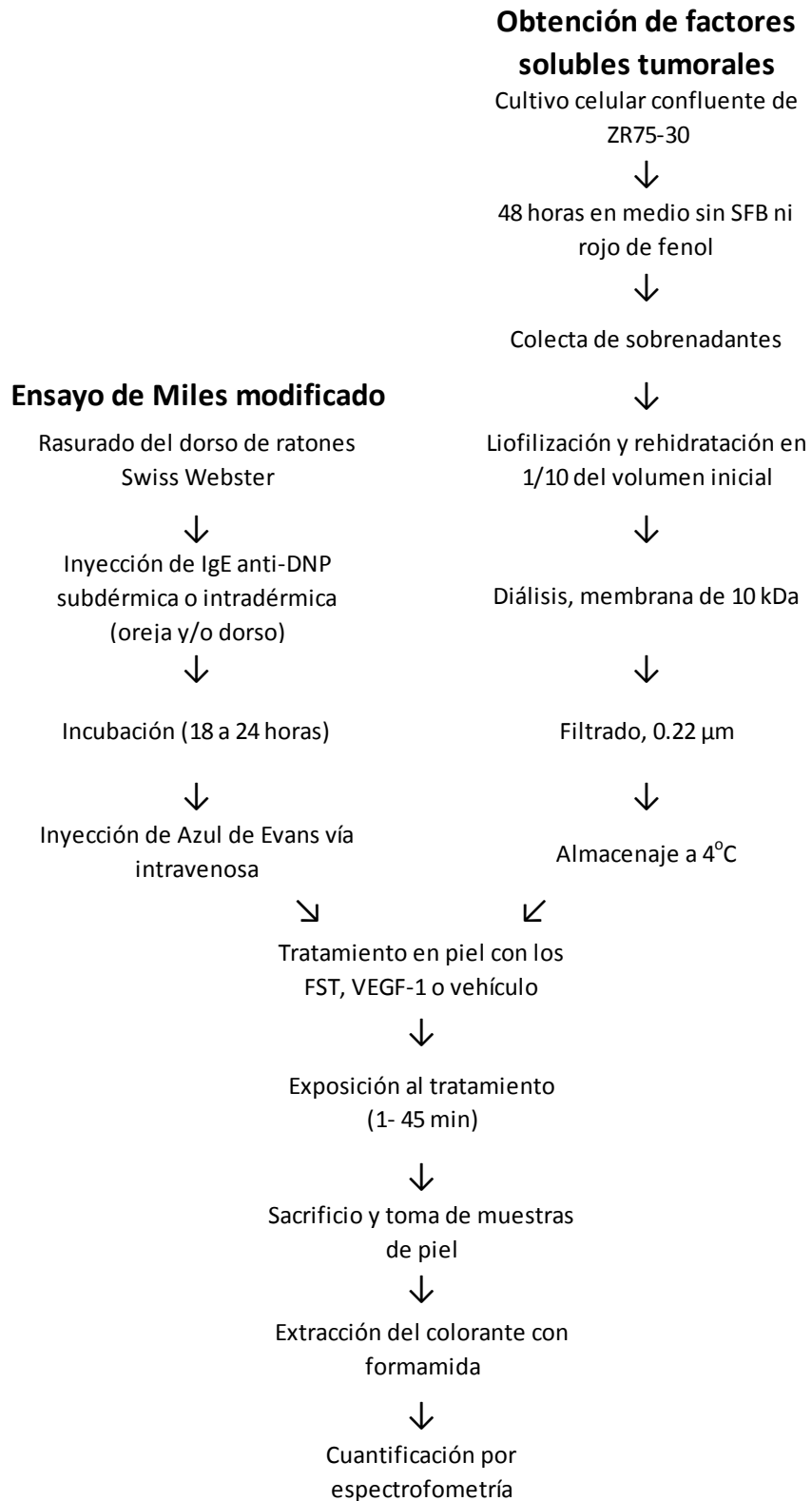
50, 75 o 150 ng de VEGF-1 o 630 ng de proteína de los FST de la línea celular de cáncer de mama ZR75-30, así como el control negativo.

Se dejaron actuar a los agentes a probar, por un periodo de 15 a 45 min. Luego de este periodo los animales se sacrificaron en una cámara de CO₂. Se tomaron muestras de piel (0.02 g) de las zonas tratadas; se incubaron en 1000, 500 o 250 µl de formamida a 56°C de 18 a 48 h. Se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 min y se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm. El aumento en la detección de azul de Evans a 620 nm es un indicador del aumento en la permeabilidad vascular.

Análisis de datos.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante las herramientas estadísticas del programa GraphPad Prism 5. Utilizándose la prueba de Kruskal-Wallis.

Estrategia Experimental



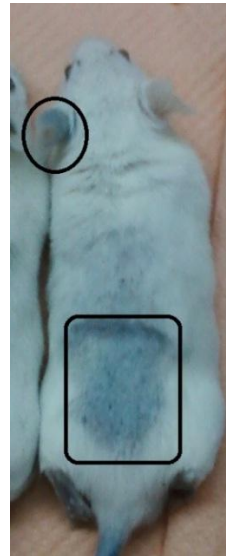
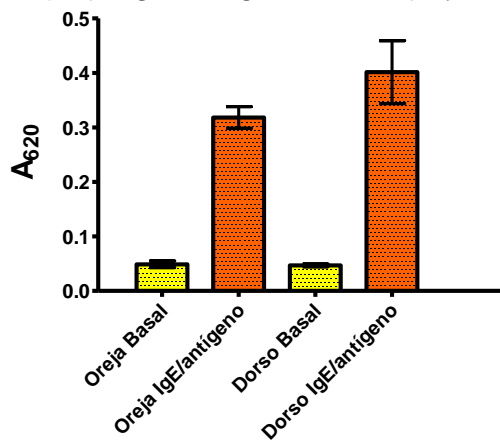
RESULTADOS

Sensibilidad al complejo IgE/antígeno: oreja vs dorso

Se utilizaron ratones Swiss Webster machos de ocho semanas de edad con un peso de entre 25 y 30 g. Como control positivo se administró IgE monoclonal anti-DNP y se dejó interactuar con las células cebadas durante 18 h; después se administró, vía la vena caudal, el antígeno DNP junto con el colorante azul de Evans; el complejo IgE/antígeno activa a las células cebadas, con lo que se libera un coctel de citocinas proinflamatorias, que a su vez activan al endotelio vascular y aumentan la permeabilidad endotelial.

El colorante Azul de Evans es capaz de unirse a la albúmina; al aumentar la permeabilidad, el azul de Evans pueda pasar del torrente sanguíneo al tejido adyacente. Por lo que, al cuantificar el colorante extravasado al tejido puede cuantificarse la extravasación de proteínas, como un índice del incremento de la permeabilidad vascular.

Inducción de permeabilidad vascular por el complejo IgE/antígeno en oreja y dorso



Inyección de IgE
Inyección de azul de Evans y DNP
18-24 horas

Figura 18. Absorbancia de azul de Evans a 620 nm, como una medida indirecta de permeabilidad vascular en piel. Izquierda: inducción de permeabilidad vascular en oreja vs dorso, se muestra error estándar, n=3 y por triplicado. Derecha: marcas en dorso y oreja.

El complejo IgE/antígeno induce permeabilidad vascular tanto en la piel del dorso como en la oreja; la extravasación del colorante es de un nivel similar en

ambas zonas (Fig.18), con la ventaja de que el dorso ofrece una mayor área de prueba.

Efecto de la profundidad de la inyección

Se analizó el área marcada por el colorante en el dorso del ratón, lo que permitió hacer una distinción entre el efecto de la inyección intradérmica y la subcutánea, se observó un patrón dependiente del tipo de inyección utilizado. El área de la marca fue mayor en los ratones a los que se les aplicó una inyección subdérmica del IgE anti-DNP. La marca fue de menor tamaño y se localizó alrededor del punto de la inyección cuando la IgE era aplicada intradérmicamente (Fig. 19).

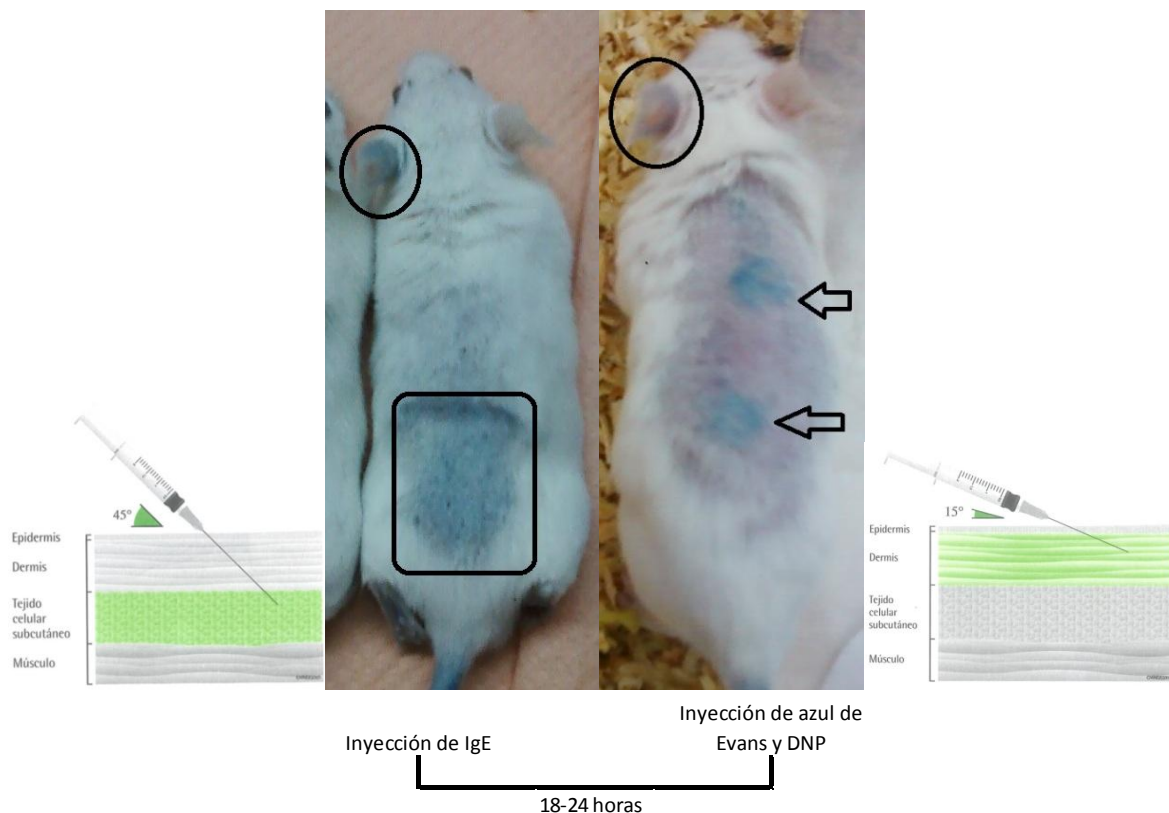


Figura 19. Patrón de la marca de azul de Evans en el dorso de los ratones Swiss Webster al inyectar IgE anti-DNP. Izquierda: Esquema de profundidad de la inyección subdérmica y marca producida en dorso (cuadrado). Derecha: Esquema de profundidad de la inyección intradérmica y marcas producidas en dorso (flechas). Las orejas inyectadas con IgE como control de permeabilidad se muestran dentro de círculos.

Sensibilidad a IgE en dorso

Se realizó una curva de dosis respuesta al complejo IgE/antígeno, para obtener la cantidad mínima necesaria para producir un incremento en la permeabilidad

vascular, se tomó como basal la permeabilidad generada al inyectar solución salina. La dosis elegida fue 240 ng, ya que el aumento en la absorción a 620 nm fue de 5.8 veces (Fig. 20); con la ventaja de observar la marca en la piel del ratón. Aunque hay un incremento de 2.07 veces al aplicar 180 ng, no fue estadísticamente significativo.

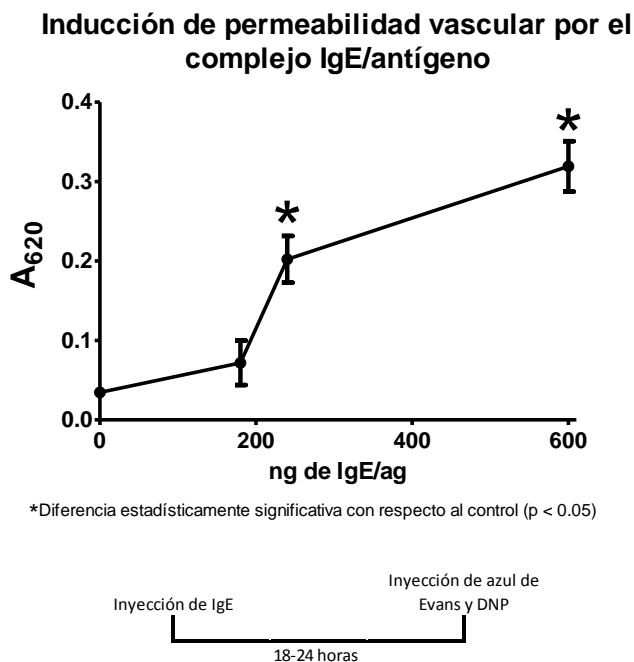


Figura 20. Inducción de permeabilidad vascular en respuesta a diferentes dosis del complejo IgE/antígeno, se muestra el error estándar.

Tiempo de administración entre el colorante y el tratamiento

Al administrar el mismo estímulo a diferentes tiempos, con respecto a la inyección de azul de Evans, se observó una menor extravasación (Fig. 21); llegó a disminuir cerca del 30% durante la primera hora.

Es muy importante realizar los tratamientos con el mismo periodo de tiempo entre la administración de Azul de Evans y los agentes a probar; de acuerdo a los resultados obtenidos se decidió que el tiempo a utilizar en los experimentos sería de 15 min.

Disminución del área de la marca

La disminución en el área de la marca fue crucial para poder aumentar el número de agentes a probar en un mismo ratón. Se pasó de probar sólo un agente, en los

primeros ratones, a probar hasta seis muestras, sin riesgo de que se superlaparan las marcas (Fig. 22).

Inducción de permeabilidad vascular dependiente del tiempo de inyección del estímulo

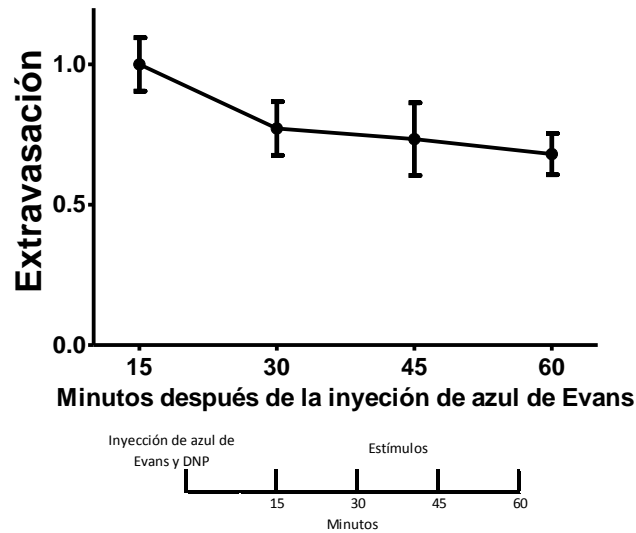


Figura 21. Se tomó como tiempo cero el momento de la inyección de azul de Evans. En el eje Y se muestra la cantidad de azul de Evans, tomando como 1 la extravasación a los 15 min. Se muestra el error estándar.

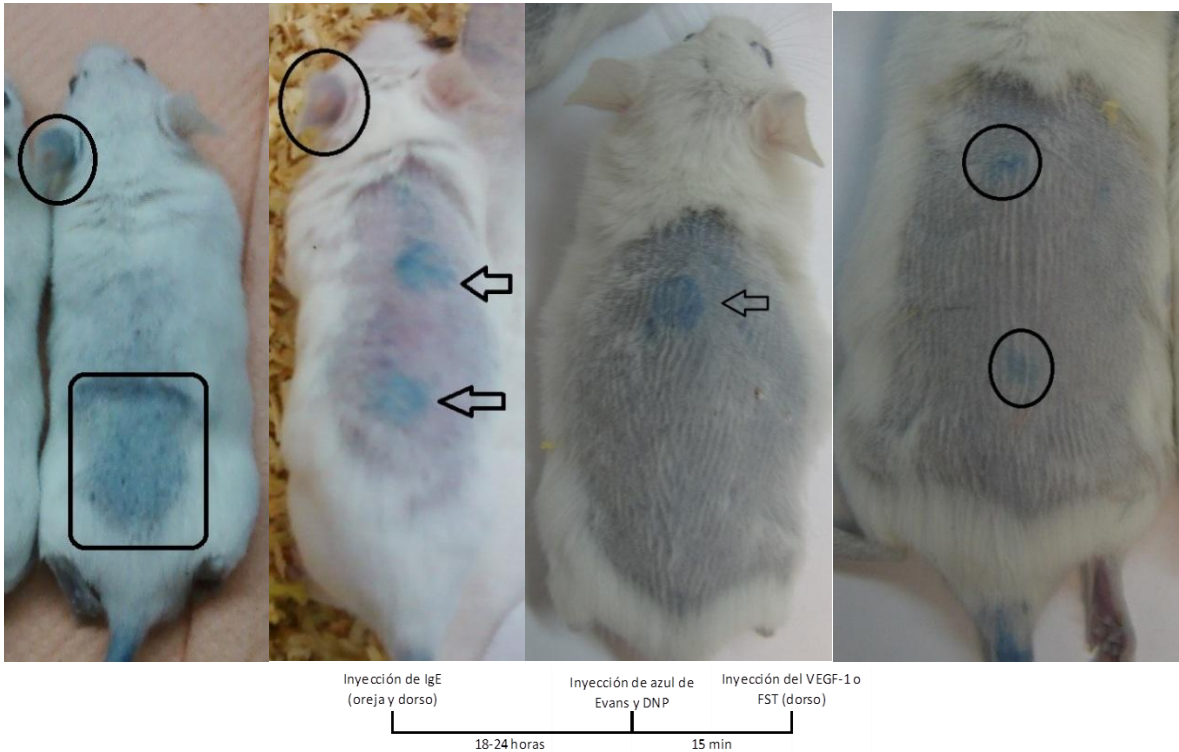


Figura 22. Reducción del área de la marca. De izquierda a derecha: IgE subdérmica, IgE intradérmica, VEGF-1 intradérmica y FST intradérmica.

Control de inyección de Azul de Evans y control de permeabilidad en dorso

Se generó un sistema con dos controles positivos: IgE/antígeno en oreja como control de la inyección de azul de Evans y VEGF-1 como control de permeabilidad en dorso. De esta forma se pueden identificar falsos negativos, resultado de una inyección incorrecta del azul de Evans en la vena de caudal (Fig. 23).

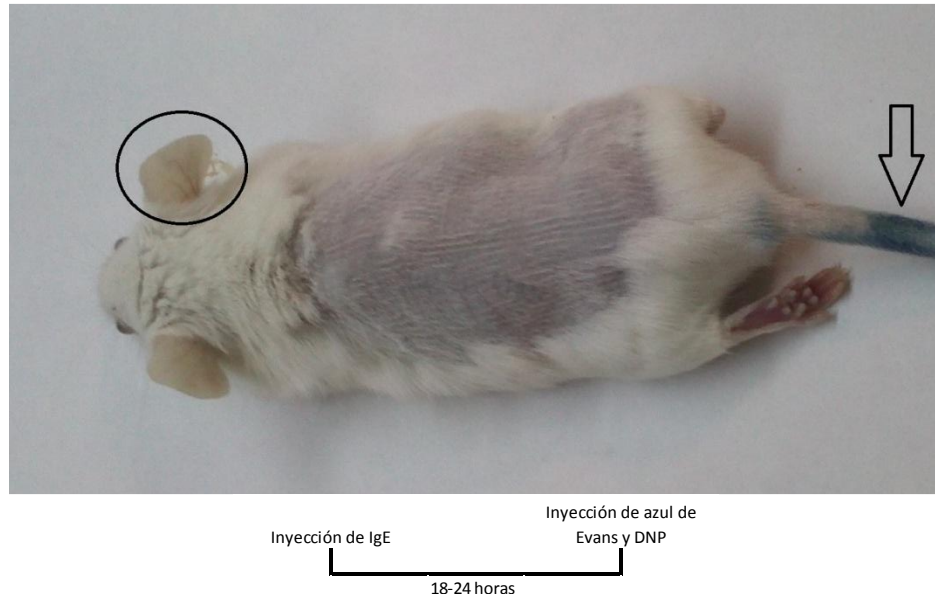


Figura 23. Detección de un falso negativo debido a una incorrecta inyección de azul de Evans. La flecha muestra el punto de inyección de azul de Evans y el círculo de la oreja muestra que no hay extravasación del colorante en la oreja

Sensibilidad a VEGF-1

Se realizó una curva de dosis respuesta para encontrar la cantidad de VEGF-1 a utilizarse. El aumento fue estadísticamente significativo a partir de 25 ng de VEGF-1, se pasó de 0.046 OD en el control a 0.111 con 25 ng de VEGF-1, y llegó hasta los 0.224 al inyectar 150 ng de VEGF-1 (Fig. 24); se decidió utilizar 25 ng.

En cuanto a la marca, fue pequeña y localizada; esto representa una ventaja, ya que al no extenderse se pueden hacer más pruebas sin que las marcas se sobrelapen, como pasa con el IgE/antígeno (Fig. 18).

Sensibilidad a FST

Se realizó el cultivo de la línea celular de cáncer de mama ZR75-30, aislada de un carcinoma ductal invasivo y de alto potencial metastásico, para obtener los factores solubles tumorales a probar en el ensayo de permeabilidad. Se obtuvo el

sobrenadante, fue congelado, resuspendido en un décimo del volumen inicial, dializado, filtrado, alicuoteado y almacenado a 4°C.

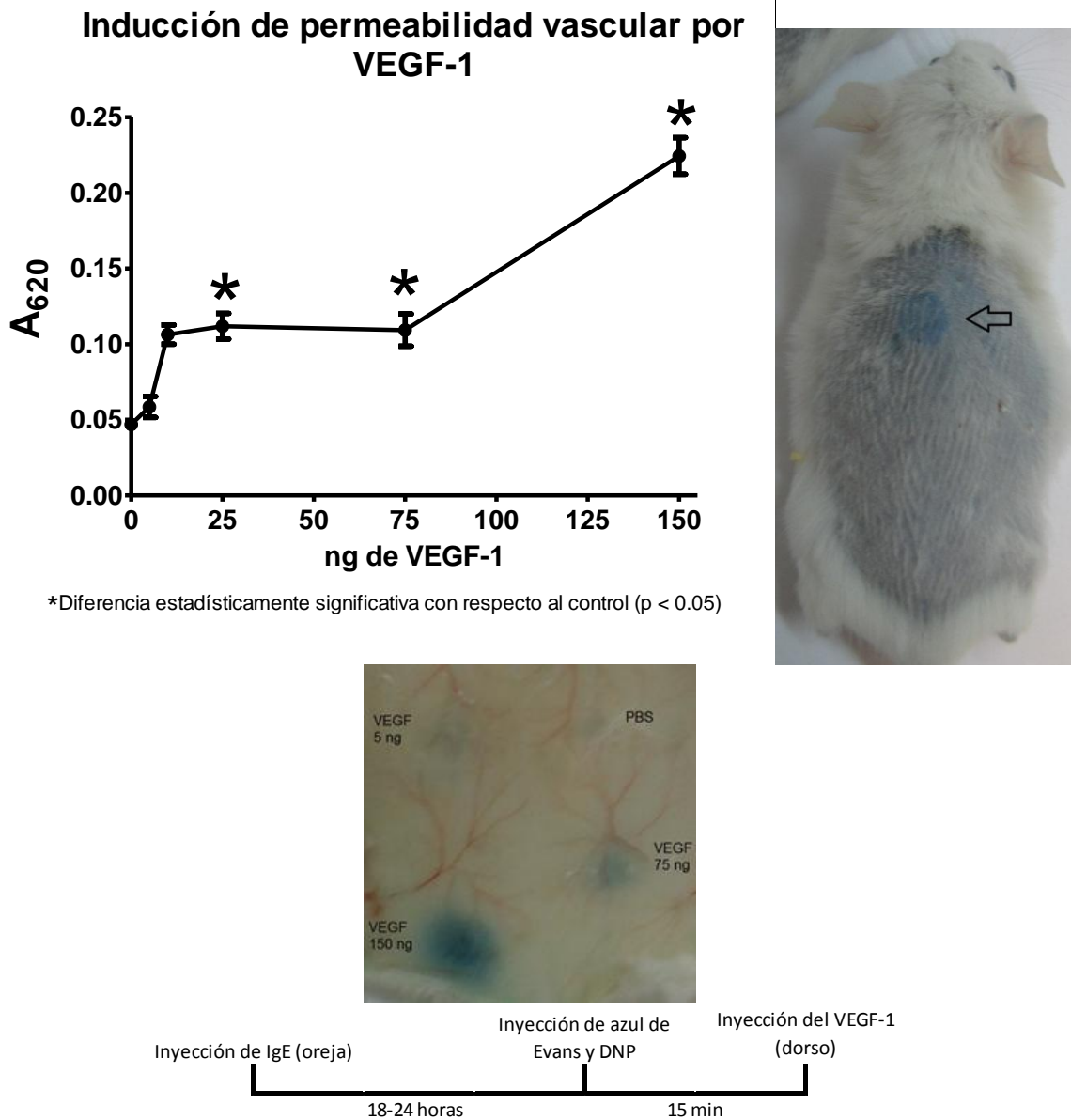
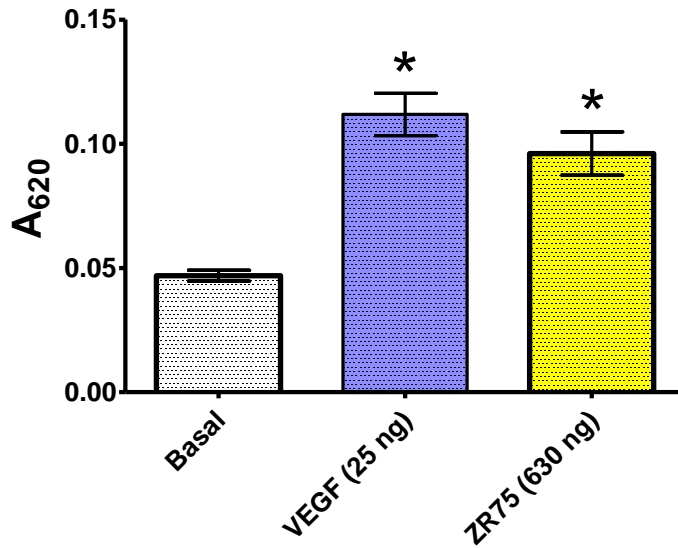


Figura 24. Sensibilidad a VEGF-1. Arriba izquierda: Inducción de permeabilidad vascular en respuesta a 5, 10, 25, 75 y 150 ng de VEGF-1 en el dorso, se muestra error estándar. Arriba derecha: marca generada en la cara externa de la piel del dorso con 150 ng de VEGF-1. Abajo: marcas generadas en la cara interna de la piel al administrar PBS, 5, 75 y 150 ng de VEGF-1.

Con los controles del sistema de permeabilidad *in vivo* montados, fue posible probar el efecto de los factores solubles tumorales. Se indujo permeabilidad vascular con los FST de ZR75-30, se aplicaron 630 ng de proteína total, para que el volumen fuera de 40 μ l, el mismo volumen usado al aplicar el VEGF y el control negativo. Se observó un incremento en la absorbancia a 620 nm

Inducción de permeabilidad vascular por VEGF-1 y FST



*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ($p < 0.05$)

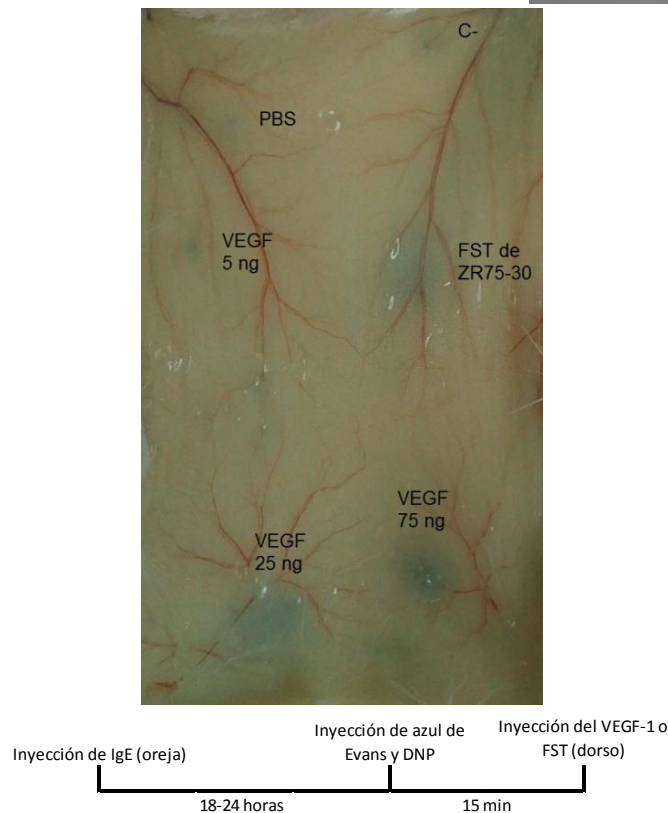
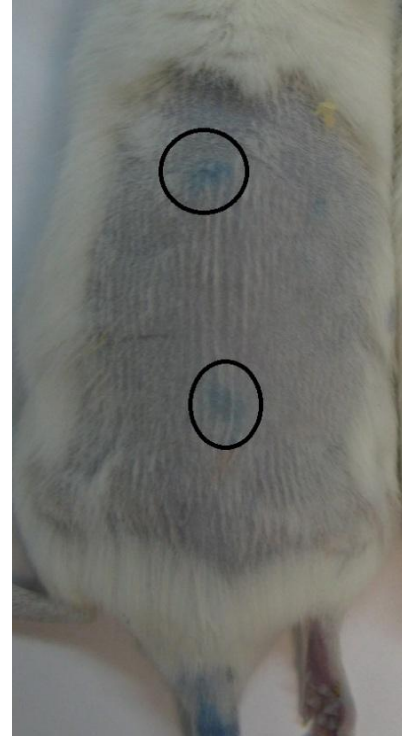
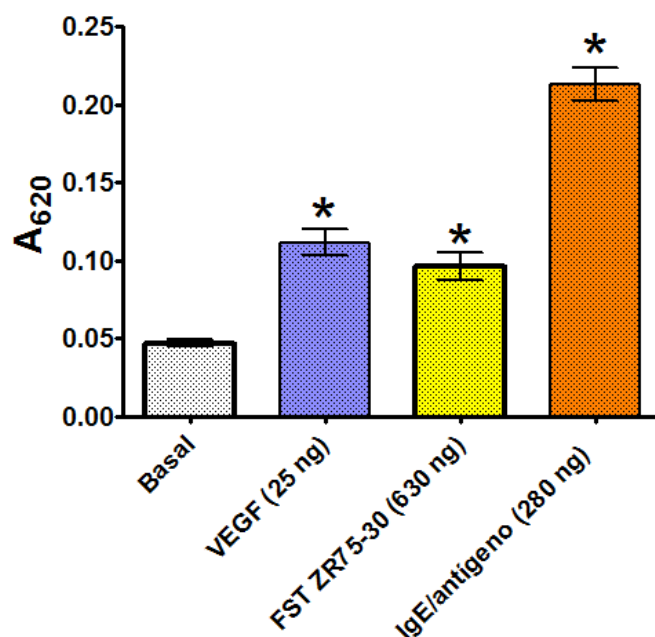


Figura 25. Arriba izquierda: Permeabilidad vascular en el dorso de ratones Swiss Webster al estimular con 25 ng de VEGF-1 ó 630 ng de proteína total de FST de ZR75-30, se muestra error estándar. Arriba derecha: el círculo superior muestra la marca generada por 25 ng de VEGF-1; el círculo inferior muestra la marca generada por 630 ng de FST de ZR75-30. Abajo: marcas generadas en la cara interna de la piel al administrar el medio sin contacto con células (C-), PBS, 630 ng de FST de ZR75-30, 5, 25 y 75 ng de VEGF-1.

en las muestras de las zonas en las que se aplicó el medio condicionado, con una media de 0.098 y llegando hasta las 0.160 densidades ópticas (OD), la media del control fue 0.046 OD (Fig. 25). El incremento en la permeabilidad vascular al aplicar los FST de ZR75-30 fue estadísticamente significativo, 2.13 veces con respecto al control.

El aumento en la permeabilidad vascular al administrar los FST de ZR75-30 fue similar al producido por el VEGF-1. La figura 26 resume los avances obtenidos en la estandarización del sistema de cuantificación de permeabilidad *in vivo*, y muestra más claramente por qué del cambio de control positivo en dorso, de IgE/antígeno a VEGF-1.

Inducción de permeabilidad vascular por VEGF-1, FST y el complejo IgE/antígeno



*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ($p < 0.05$)

Figura 26. Inducción de permeabilidad vascular por los controles positivos y los FST de ZR7530, se muestra error estándar.

DISCUSIÓN

Este trabajo se centró en la adaptación del ensayo de Miles (Miles y Miles, 1952) para cuantificar permeabilidad vascular inducida por FST. La línea celular de cáncer de mama elegida fue la ZR75-30, procede de un carcinoma ductal invasivo, por lo que su potencial metastásico es alto. La liberación de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento, explicaría el potencial metastásico de la línea celular ZR75-30. Los FST liberados promoverían la activación del endotelio vascular, un ambiente proinflamatorio, el infiltrado de leucocitos observado en tumores, y junto con esto un incremento en la permeabilidad vascular.

Hasta el momento, los ensayos de activación del endotelio por FST se habían realizado sólo *in vitro*, ya que no se contaba con un modelo *in vivo* adecuado. Una técnica de permeabilidad vascular *in vivo* que sea sensible a los FST liberados por líneas celulares de cáncer de mama, resulta útil para el estudio de las interacciones entre las células tumorales, las del endotelio vascular y del sistema inmune durante el proceso metastásico

Este trabajo partió de un ensayo de anafilaxis pasiva en oreja, utilizando como control positivo al complejo IgE/antígeno; esta variante del ensayo de Miles tiene como característica generar una respuesta de permeabilidad rápida y potente, prácticamente inmediata con respecto a la inyección del antígeno dinitrofenol y el azul de Evans.

El ensayo se adaptó al área del dorso y se utilizaron citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento, con efectos menos potentes y con un tiempo de acción más lento. Se determinó que era posible inducir permeabilidad vascular en el dorso de ratones Swiss Webster, la extravasación fue de una magnitud similar a la obtenida en oreja, pero un área mayor para realizar múltiples tratamientos. Además en el dorso los agentes a probar pueden ser administrados intradérmica o subdérmicamente, modificándose el patrón de extravasación de azul de Evans; al administrarse intradérmicamente el área de la marca se reduce, lo que permite probar más agentes.

Otro de los factores que influyen en la cantidad de azul de Evans extravasado, es el tiempo transcurrido entre la inyección del colorante y la administración del estímulo; a mayor tiempo transcurrido menor será la

extravasación. Se utilizó 15 min como tiempo estándar para los experimentos realizados.

Se diseñó un sistema con dos controles positivos: IgE/antígeno en oreja como control de inyección en la vena caudal y VEGF-1 como control de permeabilidad en dorso; de esta manera, al evitar falsos negativos se logró optimizar el uso de los agentes a probar.

Con ambos controles positivos fue posible analizar la inducción de permeabilidad vascular en respuesta a los FST de ZR75-30, llegando a la conclusión de que el ensayo permeabilidad *in vivo* montado es sensible al cambio en la permeabilidad generado por los FST.

Para explicar los resultados obtenidos, se propone un modelo de los mecanismos por los que los componentes de los FST inducen la permeabilidad vascular, mediante la interacción con los receptores tanto lumbales como basales, que se explica más adelante.

Sensibilidad a IgE/antígeno: zona y profundidad de la inyección

El ensayo de Miles que se diseñó en 1952, ha tenido múltiples modificaciones desde entonces. Una de las principales, fue utilizar el complejo IgE/antígeno para producir anafilaxis pasiva cutánea (APC) en oreja; la APC se evalúa por la cantidad de azul de Evans extravasado al aumentar la permeabilidad vascular, cuantificándolo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm (Teshima *et al.*, 1998).

La variante desarrollada por Teshima y colaboradores, es una de las más utilizadas para cuantificar permeabilidad vascular; por eso, este trabajo comenzó analizando la reacción de anafilaxis pasiva cutánea producida por el complejo IgE/antígeno en el dorso de los ratones Swiss Webster, con el fin de usar IgE/antígeno como control de permeabilidad.

Se comparó la permeabilidad vascular generada en la oreja contra la generada en el dorso; la figura 18 muestra que la extravasación de azul de Evans es similar en ambas zonas. Sin embargo, en el dorso el tamaño de la marca presentó variaciones. En el protocolo de inyección en oreja sólo es posible la inyección

intradérmica, la difusión se ve limitada y el tamaño de la marca es constante, por su anatomía tiene como máximo el tamaño de la oreja.

Se estableció una relación entre el tamaño de la marca en el dorso con la profundidad de la inyección. En una inyección intradérmica la acción del compuesto es localizada, mientras que en una subcutánea hay una mayor área de distribución, con una marca de Azul de Evans de mayor área. Esto es de suma importancia, ya que una marca grande limita el número de muestras que se pueden probar en el dorso.

Los resultados de la inyección intradérmica del complejo IgE/antígeno en dorso concuerdan con los publicados por Ali (2004) y Vennekens (2007); en el artículo de Ali y colaboradores, el nivel de extravasación de azul de Evans tiene un aumento de hasta 5 veces con respecto al nivel basal, esto es similar a lo obtenido en la curva dosis respuesta a IgE/antígeno en dorso realizada en este ensayo (Fig. 20).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que es posible inducir permeabilidad vascular en el dorso, pero la marca que se genera es muy grande. Esto es un inconveniente para su uso como control positivo de permeabilidad en dorso; como la mancha es tan extensa, puede sobrelaparse con la que se produce por los agentes a probar. Esto concuerda con lo publicado por Vennekens y colaboradores, donde sólo pudieron aplicar dos inyecciones de IgE/antígeno en el dorso de los ratones sin que se sobrelaparan.

Eliminación de azul de Evans

En los ensayos de permeabilidad vascular en el que se utiliza IgE/antígeno, la extravasación de azul de Evans es prácticamente inmediata, ya que el IgE anti DNP tuvo un periodo de incubación de 24 h, en el que pudo unirse a las células cebadas. Al administrar DNP, junto con el azul de Evans, el complejo IgE/antígeno hace que las células cebadas se degranulen (Gutman, 2011). Sin embargo, al utilizar otros agentes causantes de permeabilidad, como el VEGF-1 y los FST, el efecto es más lento, esto hace que parte del colorante sea susceptible a ser eliminado.

Los datos de la eliminación de azul de Evans que se obtuvieron concuerdan con los datos publicados por Skov (2002) y Artunc (2008): en esos artículos se muestra que al sobrepasar el punto de saturación de colorante unido a albúmina,

la tasa de eliminación de azul de Evans aumenta en proporción a la concentración inicial, a una mayor concentración hay una mayor eliminación.

A los ratones se les inyectó azul de Evans a una concentración de 0.21 mg/l, esta cantidad está por encima del punto de saturación, que es de 0.16 mg/l, por lo que el exceso de azul de Evans (no unido a la albúmina) es susceptible a ser eliminado y se puede extravasar en mayor cantidad si aumenta la permeabilidad vascular.

La concentración de azul de Evans que se usa en ensayos de permeabilidad no es fija, algunos grupos lo utilizan a un 0.1% (Vennekens *et al.*, 2007), un 0.5% (Ali *et al.*, 2002), un 1% (Mamluk *et al.*, 2005) y hasta un 4% (Jung *et al.*, 2012). Por la tasa de extravasación que presenta el azul de Evans, usar una mayor concentración permite aumentar la sensibilidad a cambios pequeños en la permeabilidad, pero no es posible establecer diferencias entre dos agentes con permeabilidad vascular similar o entre diferentes concentraciones de un mismo agente, pues el exceso de colorante no unido a la albúmina se extravasaría en grandes cantidades, incluso al haber poca permeabilidad.

Para este trabajo se utilizó una concentración de azul de Evans del 0.5%, que si bien es mayor al punto de saturación, es menor que la utilizada en otros ensayos, del 1% al 4%. Esto permite tener la agudeza para detectar cambios en la permeabilidad al usar diferentes concentraciones de los agentes a probar: IgE/antígeno, VEGF-1 y los FST.

Uso de dos controles positivos y aumento en el número de tratamientos

Se decidió agregar otro control positivo, ya que el complejo IgE/antígeno dio una señal muy alta y la marca se expandía demasiado. Se obtuvo un promedio de alrededor de 0.2 densidades ópticas al utilizar el complejo IgE/antígeno en el dorso de los ratones, cerca de 4 veces el nivel basal; sin embargo, se esperaba una reacción más discreta al probar los medios condicionados con los FST. Además, el área de la marca observada en el dorso permitía hacer sólo dos inyecciones sin riesgo de que se sobrelaparan, y la técnica de permeabilidad *in vivo* en el dorso fue elegida para poder hacer más pruebas en un mismo ratón; una ventaja sobre el tratamiento sistémico que sólo permite un tratamiento o la permeabilidad en oreja que solo permite dos tratamientos, uno por oreja.

Se utilizó VEGF-1 como otro control positivo, ya que los reportes de su uso en permeabilidad vascular en ratones muestran que pueden aplicarse más muestras, además de encontrarse en los medios condicionados de la línea celular ZR75-30 (Montes-Sánchez *et al.*, 2009). Sin embargo, la inyección de IgE en oreja resulta útil como control de una correcta inyección del azul de Evans en la vena caudal.

Una de las novedades en el trabajo realizado es el uso del complejo IgE/antígeno como control positivo de la inyección en la vena caudal. Corroborar a simple vista y en cuestión de minutos si la inyección de azul de Evans fue exitosa permite optimizar el uso de los agentes a probar; de esta forma se pueden evitar falsos negativos (Fig. 23). Esto es muy importante ya que la dificultad de la inyección en la vena caudal fue uno de los principales contratiempos durante el desarrollo de este proyecto.

Sensibilidad a VEGF-1

En el trabajo de Mamluk y colaboradores de 2005, se estudió el efecto del VEGF-1 como control positivo de permeabilidad vascular *in vivo* en piel, y se muestra una curva dosis respuesta que coincide con la que se realizó en este trabajo (Fig. 24); sin embargo, Mamluk reportó sólo hasta los 50 ng de VEGF-1, en este trabajo se probaron hasta 150 ng, a esta concentración hay un aumento considerable de la permeabilidad vascular comparada con los datos de 75 ng, algo no esperado. En la figura 24 se observa que entre los 25 y 75 ng de VEGF-1 no hay un aumento en la permeabilidad, por lo cual se esperaría que a los 25 ng se estuviera llegando al punto de saturación de los receptores; sin embargo, al administrar 150 ng hubo otro aumento en la permeabilidad vascular.

El aumento en la permeabilidad vascular observado al aplicar 150 ng de VEGF-1 puede deberse a su interacción con diferentes receptores. En cuanto a afinidad ($K_d = 33$ pM), el principal blanco de unión al VEGF-1 es el receptor 1 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR1); además, en una célula endotelial hay entre 60,000-68,000 moléculas de VEGFR1. El VEGF-1 también se une al receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR2), con una menor afinidad ($K_d = 100$ pM) en una célula endotelial se encuentran 13,000-19,000 moléculas de VEGFR2.

Aunque el VEGFR1 es más abundante y tiene una afinidad mayor por el VEGF-1, su unión no conduce a un aumento en la permeabilidad vascular; mientras que la unión a VEGFR2 sí genera un aumento en la permeabilidad vascular. Se propone que al aumentar la cantidad de VEGF-1 hasta 150 ng, los VEGFR1 llegan a saturarse y más VEGF-1 puede interactuar con los VEGFR2 presentes (Fig. 27).

El VEGF-1, además de unirse a los VEGFR1 y 2, puede unirse a la neuropilina 1 (NRP1) ($K_d = 312$ pM), cuya expresión varía entre 1,000-100,000 NRP1 por célula endotelial. La aparición de un complejo formado por VEGFR2, NRP1 y VEGF-1, aumenta la afinidad del VEGFR2 por el VEGF-1 (Stefanini *et al.* 2009).

Otro aspecto importante es que la isoforma VEGF-165 puede unir a los glicosaminoglicanos (GAGs) de la membrana basal ($K_d = 24$ nM), esto secuestra parte del VEGF-1 administrado; al aumentar la cantidad de VEGF-1 habrá una mayor cantidad disponible para interactuar con los receptores, además del VEGF-1 unido a los GAGs (Fig. 27).

Proponemos que, por ser una inyección intradérmica se activarían los receptores de la cara basal; lo cual causaría un aumento en la permeabilidad vascular, facilitando el paso del VEGF-1 vía paracelular hacia el lumen del vaso sanguíneo. Esto permitiría que se activaran los receptores tanto del lado basal como del apical de las células endoteliales. En el trabajo de Stefanini y colaboradores, se propone que la unión del VEGF-1 a los VEGFR2 es preferencial en el lado luminal de la membrana (Fig. 27), por lo que el paso del VEGF-1 vía paracelular permitiría un mayor contacto con los VEGFR2 en lado apical de las células endoteliales cercanas, generando un aumento mayor en la permeabilidad.

Efecto de los FST de ZR75-30 en la permeabilidad

Con los controles del sistema de permeabilidad *in vivo* montados, fue posible comprobar que los FST liberados por la línea celular ZR75-30 son capaces de inducir permeabilidad vascular en el dorso de ratones Swiss Webster. Al administrar los FST se llegó a 2.13 veces el nivel de permeabilidad basal (Fig. 25). La permeabilidad generada por los FST fue similar a la inducida por el VEGF-1.

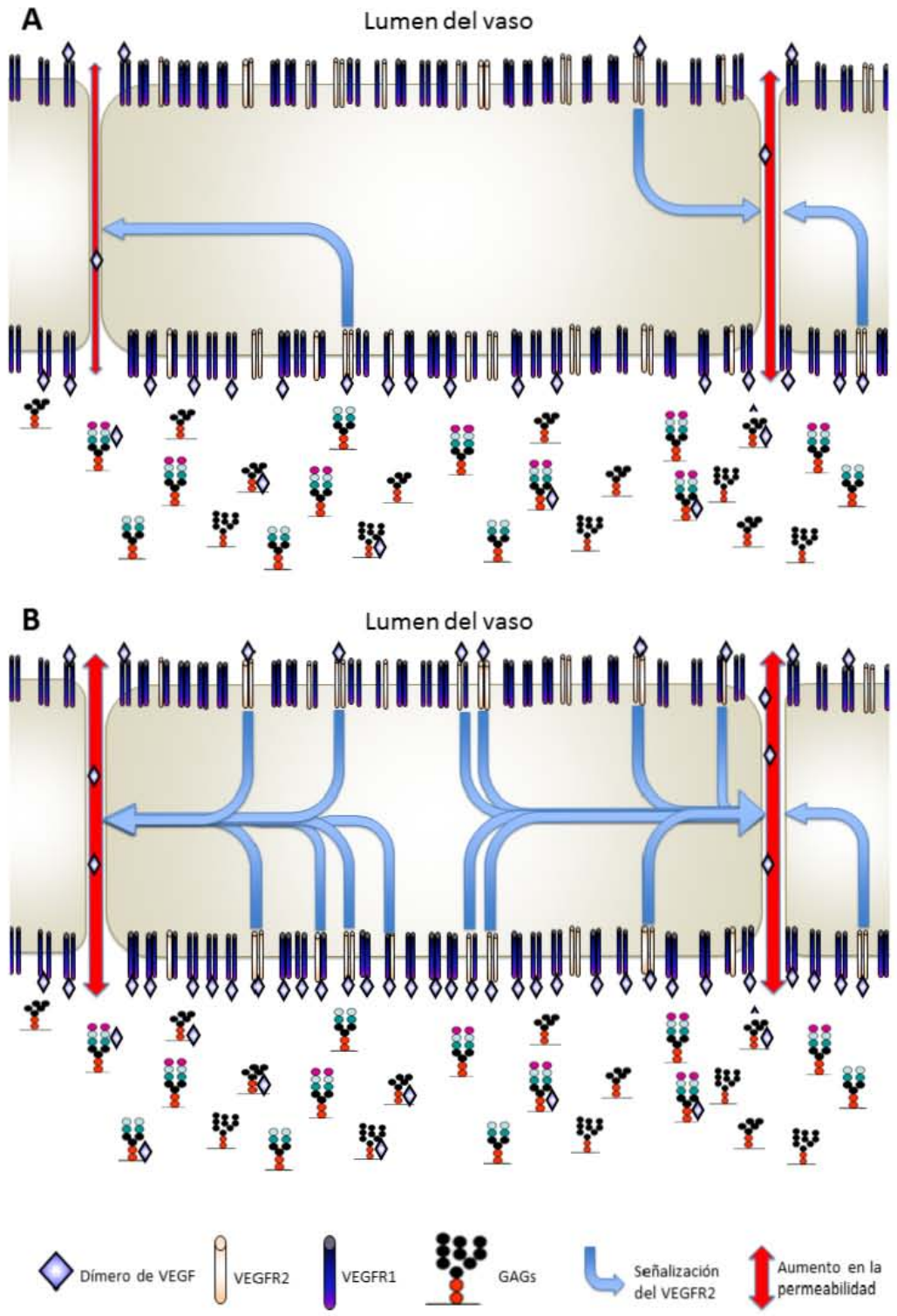


Figura 27. Inducción de permeabilidad por VEGF-1 en diferentes dosis. Panel A: el esquema muestra el secuestro del VEGF-1 por los glicosaminoglicanos y el VEGFR-1. Panel B: al duplicar la dosis de VEGF-1 aumenta la interacción con los VEGFR-2, además del VEGF-1 secuestrado, por lo que hay una mayor inducción de permeabilidad vascular.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se encontró que las células ZR75-30 liberan VEGF-1 (Montes-Sánchez *et al.*, 2009). El efecto del VEGF-1 en la activación del endotelio y en la permeabilidad vascular puede ser sinérgico con el de otros mediadores de la inflamación presentes en los FST.

La IL-8 también se encuentra en los FST de ZR75-30 (Montes-Sánchez *et al.*, 2009); se ha reportado la transactivación del VEGFR2 por los receptores de IL-8, CXCR1 y CXCR2 (Petreaca *et al.*, 2007). La unión de la IL-8 a sus receptores promueve la fosforilación del VEGFR2 y la generación de permeabilidad de manera independiente de la presencia del VEGF-1. Las células endoteliales no sólo responden al VEGF-1, sino que también lo secretan; el trabajo de Martin y colaboradores de 2009, muestra que la IL-8 promueve la síntesis y secreción de VEGF-1 en células endoteliales, mediante la activación de la vía de NF-κB.

Se propone que la IL-8 presente en los FST de ZR75-30 promueve la permeabilidad vascular mediante la transactivación de los receptores VEGFR2 y mediante la síntesis y secreción de VEGF-1 (Fig. 28).

Inducción de permeabilidad vascular por la IL-8

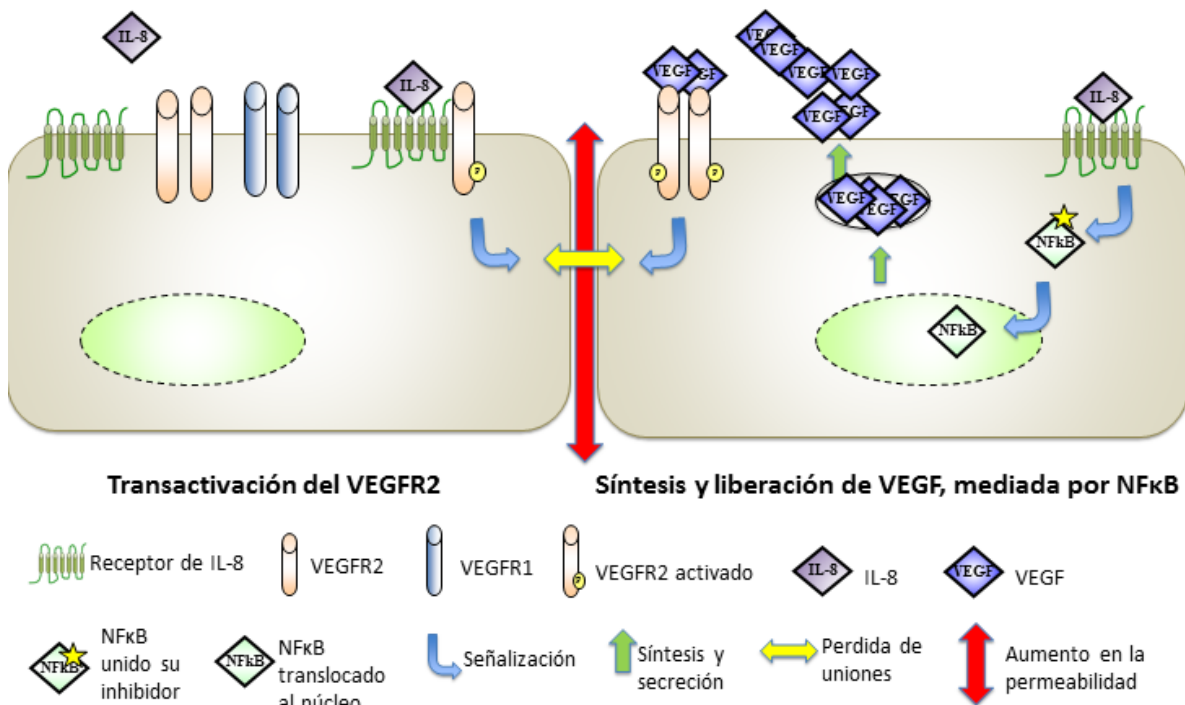


Figura 28. Mecanismos de inducción de permeabilidad por la IL-8. Izquierda: transactivación del VEGFR-2 por la IL-8 unida a su receptor. Derecha: La IL-8 induce la síntesis y secreción de VEGF-1, que tiene un efecto autocrino y paracrino al interactuar con los VEGFR-2.

El GM-CSF y la IL-6 presentes en los FST de ZR75-30 no tendrían un efecto directo sobre la permeabilidad vascular, sino que podrían actuar inhibiendo la diferenciación hacia células presentadoras de antígenos y promoviendo la diferenciación hacia monocitos/macrófagos (Menetrier-caux *et al.*, 1998). El efecto sobre la permeabilidad vascular sería secundario, generado por la degranulación de los monocitos/macrófagos atraídos hacia el endotelio activado; este efecto se daría durante una exposición crónica a los FST.

MCP-1 es un quimioatrayente que, de igual forma que la IL-6 y el GM-CSF, no aumentaría la permeabilidad directamente, sino que aumentaría la permeabilidad mediante el reclutamiento de monocitos y su adhesión a las células endoteliales, mediante la sobreexpresión de Mac-1, el receptor para ICAM expresada en el endotelio (Deshmane *et al.*, 2009). Sin embargo, el MCP-1 atraería los monocitos hacia el tumor primario o hacia un tumor secundario en crecimiento, y no participaría directamente en el proceso de extravasación de células metastásicas.

Los FST de los medios condicionados pueden promover la permeabilidad vascular de una manera directa, por la acción del VEGF-1 y la IL-8, y de forma indirecta por el efecto de la IL-6 y el GM-CSF en la proliferación de monocitos/macrófagos, que pueden ser atraídos hacia el endotelio activado. Una vez que las células tumorales se han extravasado (o en tumor primario) la liberación de MCP-1 promovería el reclutamiento de macrófagos y, junto con el VEGF-1 e IL8, promovería la angiogénesis.

¿Es válido el modelo de permeabilidad vascular mediada por los FST?

Las células endoteliales tienen receptores para citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento tanto en la cara basal como en la apical; debido a que parte de las señales que reciben provienen del intersticio/tejido y parte del lumen de los vasos sanguíneos. En un proceso metastásico los FST son secretados a los vasos sanguíneos o linfáticos desde el interior del tumor, se transportan en la sangre y tienen contacto con los receptores de la cara apical del endotelio, generando permeabilidad vascular. Sin embargo, los FST de la línea celular ZR75-30 podrían atravesar el endotelio vía paracelular y activar también los receptores de la cara basal (Fig. 29).

De los FST reportados en los medios condicionados de ZR75-30 el dímero de VEGF-165 es el compuesto con el mayor radio molecular, 3.02 nm (Stefanini *et al*, 2008), pero aún se sitúa dentro del rango de difusión pasiva, aunque limitada. La difusión de los FST se incrementa al aumentar la permeabilidad vascular.

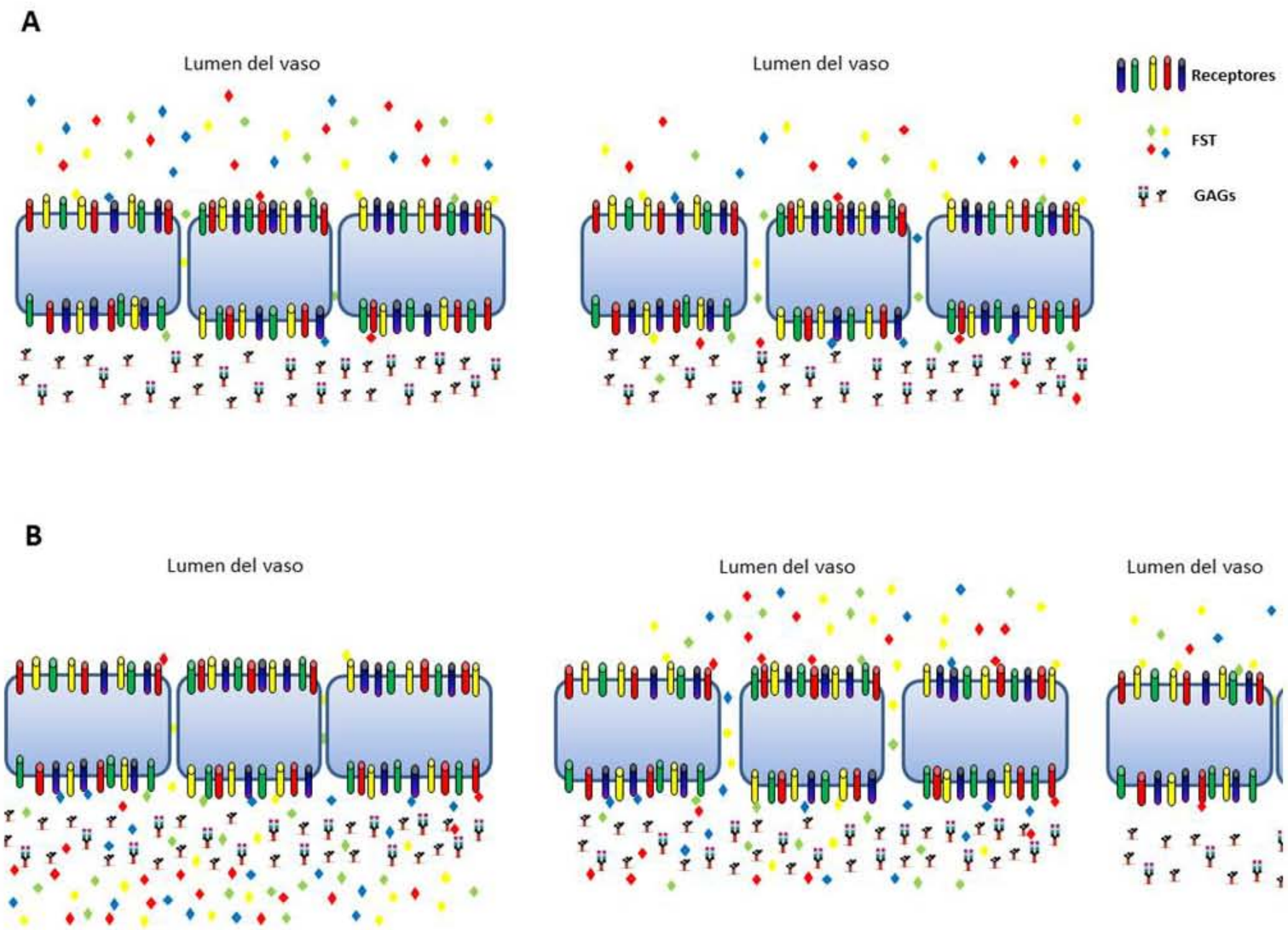


Figura 29. Interacción de los factores solubles tumorales con los receptores luminales y basales. Panel A: durante un proceso de metástasis a partir de un tumor primario. Panel B: durante la administración intradérmica durante los experimentos.

En el modelo propuesto en este trabajo, los FST de ZR75-30 son administrados en la piel por lo que el primer contacto es con la cara basal del endotelio. Por su radio molecular los FST pueden difundir hacia la luz del vaso, activar a los receptores apicales, entrar en el torrente sanguíneo y dispersarse (Fig. 29). El flujo del intersticio hacia el lumen aumenta si la permeabilidad vascular se incrementa por la unión de los FST a los receptores de la cara basal; en este caso la IL-8 y el VEGF-1 presentes en el medio condicionado de la línea celular ZR75-30.

En este ensayo de permeabilidad vascular *in vivo* los FST se relacionan con el endotelio de una manera similar a como lo harían en un proceso de metástasis. Los FST aplicados intradérmicamente pueden interactuar tanto con los receptores basales como con los apicales del endotelio, además de dispersarse por la luz del vaso. Por lo tanto, tomamos este modelo como válido para estudiar la permeabilidad vascular mediada por los FST.

¿Qué tan relevante es la permeabilidad vascular mediada por FST en el proceso de metástasis?

El incremento en la permeabilidad vascular es independiente de la adhesión celular entre el endotelio y las células metastásicas. El trabajo de Eum y colaboradores en 2004, demostró que *in vitro* la permeabilidad y la expresión de moléculas de adhesión tienen vías de señalización separadas, pero que ambas son necesarias para la migración transendotelial. Al inhibir al receptor del VEGF-1 se abatió el aumento en la permeabilidad vascular y la migración transendotelial de la línea de cáncer de mama MDA-MB-231; pero no se abatió su adhesión a las células endoteliales estimuladas por el tratamiento con PCB104.

La presencia de moléculas como selectinas E y P, ICAM y VCAM favorecen el reclutamiento de células del sistema inmune. Se ha propuesto que las células metastásicas presentan un mecanismo similar de extravasación, por lo que se espera que el endotelio activado sea “adhesivo” también para las células metastásicas. Esto concordaría con el ensayo de Orr y colaboradores de 2000, en el que se observó que el daño y activación del endotelio pulmonar por la inhalación de bleomicina lleva a una metástasis preferencial de fibrosarcomas; el modelo usado por Orr también promueve la permeabilidad vascular.

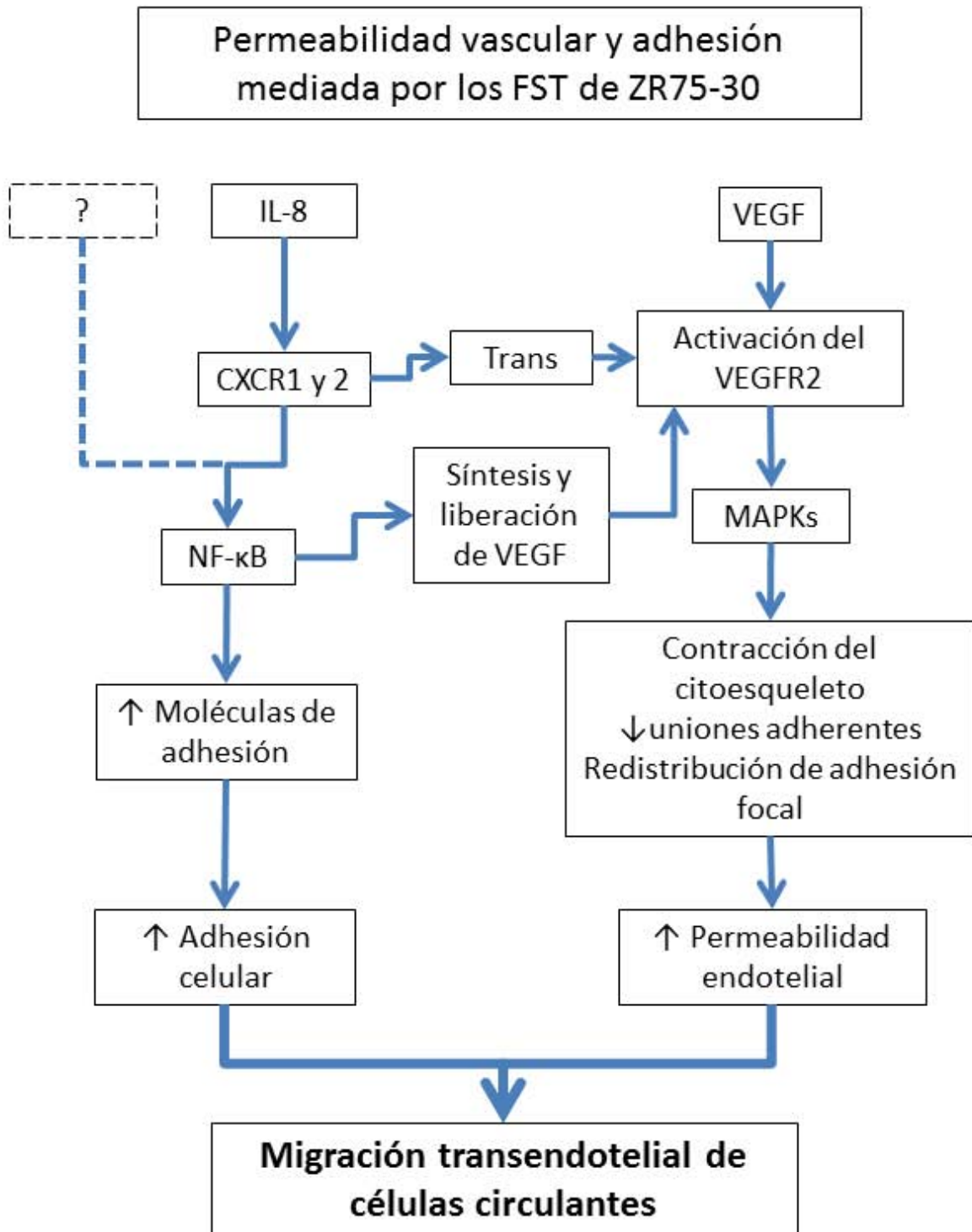


Figura 30. Mecanismo propuesto para la inducción de permeabilidad vascular y aumento en la adhesión celular del endotelio, necesarios para la extravasación de células circulantes.

La trans migración endotelial es favorecida por un incremento en la adhesión celular y en la permeabilidad vascular. Los factores solubles tumorales promueven

la expresión de moléculas de adhesión en células HUVEC mediante la activación de la vía de NF- κ B (Estrada-Bernal *et al.*, 2003). Además, en este trabajo se demostró el incremento en la permeabilidad vascular *in vivo* por los FST de ZR75-30.

Los medios condicionados de las células ZR75-30 podrían activar al endotelio a través de diferentes mediadores y diferentes vías de señalización, generando un aumento en la permeabilidad vascular y en la expresión de moléculas de adhesión (Fig. 30). Los trabajos *in vitro* proponen que el aumento en la adhesión es mediante la activación de la vía de NF- κ B (Estrada-Bernal *et al.*, 2003), probablemente por la IL-8 presente entre los FST; al mismo tiempo, los FST generarían un incremento en la permeabilidad vascular por la IL-8 y el VEGF-1, probablemente por la vía de las MAP-cinasas y PI3K (Kumar *et al.*, 2012).

In vivo la activación del endotelio, con el aumento en la permeabilidad y la expresión de moléculas de adhesión en la membrana apical, podría acelerar el proceso de extravasación de células circulantes, tanto metastásicas como del sistema inmune (Fig. 30).

Con el modelo de permeabilidad vascular *in vivo* que se desarrolló, es posible comparar la capacidad de diferentes líneas celulares para modificar la permeabilidad vascular; mediante cortes histológicos se podría analizar la expresión de moléculas de adhesión y el infiltrado de células circulantes; además de verificar la activación de vías de señalización, mediante el tratamiento con inhibidores farmacológicos.

CONCLUSIONES

1. En este trabajo se desarrolló un sistema de permeabilidad *in vivo* sensible a la inducción, tanto por el complejo IgE/antígeno, como por el VEGF-1 y el medio condicionado de la línea de cáncer de mama ZR75-30.
 - 1.1. Se generó un sistema con dos controles positivos: IgE/antígeno (280 ng), aplicado en la oreja como indicador de una correcta inyección en la vena caudal y VEGF-1 (25 ng) como control de la permeabilidad en el dorso.
 - 1.2. Se caracterizó el efecto de la profundidad de la inyección; los mejores resultados se obtuvieron mediante la inyección intradérmica, ya que el área de la marca es menor. Se estableció que el tiempo de espera óptimo entre la administración de azul de Evans y la administración de los tratamientos a probar, VEGF-1 y FST, debe ser de 15 min.
 - 1.3. Se determinó la permeabilidad vascular basal en los ratones Swiss Webster. Al administrar VEGF-1 y FST de ZR75-30, la permeabilidad incrementó hasta 2.41 y 2.13 veces con respecto al nivel basal.
 - 1.4. En el sistema montado los FST tendrían contacto tanto con los receptores basales como con los apicales de las células endoteliales, además de dispersarse por la luz del vaso, como pasaría en el proceso metastásico.
2. Los resultados de este trabajo indican que los factores solubles liberados por la línea celular ZR75-30 son capaces de inducir permeabilidad vascular en el dorso de ratones Swiss Webster, aumentándola a 2.13 veces con el nivel basal.

La técnica de permeabilidad desarrollada se describe en el Anexo I

PERSPECTIVAS

El modelo de permeabilidad vascular *in vivo* sensible a FST, puede utilizarse para profundizar en el estudio del proceso metastásico, al analizar las interacciones entre el endotelio, las células del sistema inmune y cancerosas.

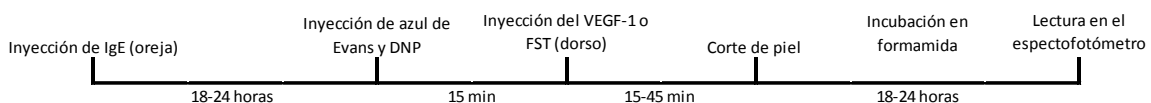
El desarrollo de esta técnica permitirá:

- Analizar el efecto sobre la permeabilidad vascular de los FST de diversas líneas celulares de cáncer de mama, u otros tipos de cáncer, con diferente potencial metastásico.
- Identificar las vías que estén implicadas en el proceso de permeabilidad vascular y metástasis, al utilizar tratamientos con inhibidores de vías de señalización, como el BAY117085 y la aspirina que bloquean la vía de NF- κ B.
- Evaluar la infiltración de células del sistema inmune y/o tumorales, así como la modificación en la distribución de las proteínas de las uniones intercelulares del endotelio; esto, mediante cortes histológicos de la zona donde se apliquen los FST.
- Comprobar si el aumento en la permeabilidad vascular, causado por los FST, lleva a un metástasis preferencial *in vivo*, mediante la inyección de los FST en piel y las células metastásicas vía la vena caudal.

ANEXO I

ENSAYO DE PERMEABILIDAD VASCULAR *IN VIVO* DESARROLLADO

1. Los animales se anestesian, vía intraperitoneal, con una mezcla de ketamina (94 mg/kg) y xilacina (5.66 mg/kg) y se rasuran del dorso.
2. Se inyectan 280 ng de inmunoglobulina E anti-DNP en la oreja, como control de la inyección en la vena caudal.
3. Se deja interactuar a la IgE anti-DNP con los mastocitos presentes en la piel, entre 18 a 24 h.
4. Se inyectan, vía la vena caudal, 100 µl de Azul de Evans (0.5% en agua) y 100 ng del antígeno dinitrofenol.
5. Se anestesian los ratones, con la mezcla de Ketamina/Xilacina.
6. Se espera 15 min a que el azul de Evans y el DNP circulen por la vasculatura.
7. Los FST a probar (630 ng de proteína total) y el control de VEGF-1 (25 ng) se inyectan en el dorso (intradérmicamente).
8. Se dejan actuar a los agentes a probar, por un periodo de 15 a 45 min.
9. Luego de este periodo los animales se sacrifican en una cámara de CO₂.
10. Se toman muestras de piel de las zonas tratadas, aproximadamente 0.020 g.
11. Se incuban en 150 µl de formamida a 56°C de 18 a 24 h.
12. Se centrifugan a 5,000 rpm durante 5 min.
13. Se leen las muestras por espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm.



ANEXO II

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS DE PERMEABILIDAD *IN VIVO*,
REALIZADOS EN GRAPHPAD PRISM 5.

1way ANOVA Tabular results				
1	Table Analyzed	Respuesta a IgE/antígeno		
2				
3	Kruskal-Wallis test			
4	P value	0.0003		
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
6	P value summary	***		
7	Do the medians vary signif. (P <	Yes		
8	Number of groups	4		
9	Kruskal-Wallis statistic	18.90		
10				
11	Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
12	0 vs 180	-2.686	No	ns
13	0 vs 240	-10.93	Yes	*
14	0 vs 600	-16.07	Yes	***
15	180 vs 240	-8.243	No	ns
16	180 vs 600	-13.39	Yes	*
17	240 vs 600	-5.143	No	ns

1way ANOVA Column statistics		A	B	C	D	E	F	G
		0	180	240	600	Title	Title	Title
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of values	7	5	7	7			
2								
3	Minimum	0.0190	0.0190	0.1080	0.1950			
4	25% Percentile	0.0220	0.0205	0.1160	0.2170			
5	Median	0.0300	0.0700	0.1620	0.3420			
6	75% Percentile	0.0390	0.1240	0.2780	0.3660			
7	Maximum	0.0650	0.1740	0.2960	0.4420			
8								
9	Mean	0.03457	0.0718	0.2021	0.3191			
10	Std. Deviation	0.01533	0.06269	0.07796	0.08415			
11	Std. Error	0.005793	0.02804	0.02947	0.03180			
12								
13	Lower 95% CI	0.02040	-0.006042	0.1300	0.2413			
14	Upper 95% CI	0.04875	0.1496	0.2742	0.3970			

1way ANOVA Tabular results				
1	Table Analyzed	Curva de dosis respuesta a VEGF		
2				
3	Kruskal-Wallis test			
4	P value	< 0.0001		
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
6	P value summary	***		
7	Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
8	Number of groups	6		
9	Kruskal-Wallis statistic	34.25		
10				
11	Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
12	Basal vs VEGF 5 ng	-4.682	No	ns
13	Basal vs VEGF 10 ng	-17.18	No	ns
14	Basal vs VEGF 25 ng	-19.68	Yes	*
15	Basal vs VEGF 75 ng	-17.61	Yes	*
16	Basal vs VEGF 150 ng	-31.18	Yes	***
17	VEGF 5 ng vs VEGF 10 ng	-12.50	No	ns
18	VEGF 5 ng vs VEGF 25 ng	-15.00	No	ns
19	VEGF 5 ng vs VEGF 75 ng	-12.93	No	ns
20	VEGF 5 ng vs VEGF 150 ng	-26.50	Yes	**
21	VEGF 10 ng vs VEGF 25 ng	-2.500	No	ns
22	VEGF 10 ng vs VEGF 75 ng	-0.4286	No	ns
23	VEGF 10 ng vs VEGF 150 ng	-14.00	No	ns
24	VEGF 25 ng vs VEGF 75 ng	2.071	No	ns
25	VEGF 25 ng vs VEGF 150 ng	-11.50	No	ns
26	VEGF 75 ng vs VEGF 150 ng	-13.57	No	ns

1way ANOVA Column statistics		A	B	C	D	E	F
		Basal	VEGF 5 ng	VEGF 10 ng	VEGF 25 ng	VEGF 75 ng	VEGF 150 ng
		Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of values	11	4	6	6	7	7
2							
3	Minimum	0.0360	0.0460	0.0860	0.0730	0.0830	0.1910
4	25% Percentile	0.0410	0.0475	0.0935	0.1000	0.0890	0.1990
5	Median	0.0460	0.0550	0.1055	0.1170	0.0980	0.2160
6	75% Percentile	0.0540	0.0730	0.1178	0.1243	0.1280	0.2460
7	Maximum	0.0580	0.0780	0.1320	0.1340	0.1620	0.2840
8							
9	Mean	0.04691	0.0585	0.1063	0.1118	0.1093	0.2244
10	Std. Deviation	0.007273	0.01389	0.01565	0.02080	0.02818	0.03186
11	Std. Error	0.002193	0.006946	0.006391	0.008491	0.01065	0.01204
12							
13	Lower 95% CI	0.04202	0.03639	0.08990	0.09001	0.08323	0.1950
14	Upper 95% CI	0.05179	0.08061	0.1228	0.1337	0.1353	0.2539
15							

1way ANOVA Tabular results				
1	Table Analyzed	VEGF y FST de ZR7530		
2				
3	Kruskal-Wallis test			
4	P value	< 0.0001		
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
6	P value summary	***		
7	Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
8	Number of groups	3		
9	Kruskal-Wallis statistic	19.34		
10				
11	Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
12	Basal vs VEGF (25 ng)	-15.25	Yes	***
13	Basal vs ZR75 (20 µg)	-12.45	Yes	***
14	VEGF (25 ng) vs ZR75 (20 µg)	2.800	No	ns

1way ANOVA Column statistics		A	B	C	D	E
		Basal	VEGF (25 ng)	ZR75 (20 µg)	Title	Title
		Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of values	11	6	10		
2						
3	Minimum	0.0360	0.0730	0.0740		
4	25% Percentile	0.0410	0.1000	0.07745		
5	Median	0.0460	0.1170	0.08385		
6	75% Percentile	0.0540	0.1243	0.1171		
7	Maximum	0.0580	0.1340	0.1600		
8						
9	Mean	0.04691	0.1118	0.09608		
10	Std. Deviation	0.007273	0.02080	0.02761		
11	Std. Error	0.002193	0.008491	0.008732		
12						
13	Lower 95% CI	0.04202	0.09001	0.07633		
14	Upper 95% CI	0.05179	0.1337	0.1158		

Anexo III

SOLUCIONES UTILIZADAS.

Solución amortiguadora de Fosfatos (PBS) 1 litro

NaCl	137 mM	8 g
KCl	2.7 mM	0.2 g
KH ₂ PO ₄	4.3 mM	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ <i>anhidro</i>	1.4 mM	2.16 g
(pH = 7.2-7.4)		

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

Solución de Verseno 1 litro

NaCl	136 mM	8 g
Tris	28 mM	3.04 g
KCl	5.4 µM	0.4 g
EDTA	0.5 µM	0.2 g
(pH = 7.7)		

Esterilizar en autoclave y mantener a temperatura ambiente.

Tripsina 0.1% 1 litro

1 g de tripsina en 1 litro de solución de verseno.

Disolver la tripsina en el verseno, esterilizar la mezcla por filtración y hacer alícuotas que se guardan a -20°C, o a 4°C para uso continuo.

Solución Salina Fisiológica

Solución Isotónica de Cloruro de Sodio al 0.9%, Abbott.

Medio RPMI 1640

	Peso molecular	Concentración (mg/L)	mM
Aminoácidos			
Glicina	75	10	0.133
L-Arginina	174	200	1.15
L-Asparagina	132	50	0.379
L-aspartato	133	20	0.15

L-Cistina (2HCl)	313	65	0.208
L-Fenilalanina	165	15	0.0909
L-Glutamato	147	20	0.136
L-Glutamina	146	300	2.05
L-hidroxiprolina	131	20	0.153
L-Histidina	155	15	0.0968
L-Isoleucina	131	50	0.382
L-Leucina	131	50	0.382
L-Lisina (HCl)	183	40	0.219
L-Metionina	149	15	0.101
L-Prolina	115	20	0.174
L-Serina	105	30	0.286
L-Treonina	119	20	0.168
L-Triptófano	204	5	0.0245
L-Tirosina (Na ²⁺ 2H ₂ O)	261	29	0.111
L-Valina	117	20	0.171
Vitaminas			
Ácido fólico	441	1	0.00227
Acido para-aminobenzoico	137	1	0.0073
Biotina	244	0.2	0.00082
Colina Cl ⁻	140	3	0.0214
D-Pantotenato de Calcio	477	0.25	0.000524
Niacinamida	122	1	0.0082
Piridoxina (HCl)	206	1	0.00485
Riboflavina	376	0.2	0.000532
Tiamina (HCl)	337	1	0.00297
Sales inorgánicas			
Cloruro de potasio (KCl)	75	400	5.33
Cloruro de sodio (NaCl)	58	6000	103.43
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O)	268	800	2.99
Nitrato de calcio (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	236	100	0.424
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ -7H ₂ O)	246	48.84	0.199
Otros componentes			
D-Glucosa (dextrosa)	180	2000	11.11
Glutati3n (reducido)	307	1	0.00326
Rojo de fenol	376.4	5	0.0133

El contenido de un sobre de polvo de medio RPMI 1640 sin glutamina y sin bicarbonato de sodio se disuelve en un litro de agua; se agregan 2 g de bicarbonato

de sodio, 0.3 g de glutamina, y 1 ml de antibiótico (penicilina) y antimicótico (anfotericina). Se ajusta el pH utilizando HCl 1N o NaOH 0,1N o gasificando con CO₂. Se esteriliza en autoclave y se mantiene a 4°C.

Complejo IgE/antígeno

Anticuerpo monoclonal anti-dinitrofenol producido en ratón; Isotipo IgE a una concentración de 1 mg/ml.

Solución 0.01 M en PBS, pH 7.4, con 15 mM de azida de sodio.

Sigma-Aldrich (D8406).

Al momento de usarse se hace una dilución 1:40, llegando a una concentración de 40 ng/μl.

Albúmina-Dinitrofenol, polvo producto de liofilización. 30-40 moles de DNP por mol de albúmina.

Sigma-Aldrich (A6661).

Se mezclan 100 ng de DNP en 100 μl de azul de Evans al 0.5%.

Azul de Evans

Colorante Azul de Evans, en polvo.

Sigma-Aldrich (E2129).

Se agregan 0.25g de azul de Evans a 50 ml de H₂O milli Q, (0.5%). La mezcla se pasa por un filtro de 0.22 μm.

Se almacena a temperatura ambiente hasta su uso, filtrándose nuevamente al momento de usarse.

Microgel para separar proteínas

Separador

H ₂ O	3.35 ml
Tris 1.5M pH 8.8	2.5 ml
Acrilamida:bisacrilamida 30:0.8	4.0 ml
SDS 10%	100 μl
APS 10%	50 μl (1 ml-.01 g)
TEMED	5 μl
Volumen total	10.005 ml

Concentrador

H ₂ O	3.05 ml
Tris 0.5 M pH 6.8	1.25 ml
Acrilamida:bisacrilamida	0.66 ml
SDS 10%	50 µl
APS	25 µl
TEMED	5 µl
Volumen total	5.04 ml

Buffer de muestra

25 ml 4× Tris•Cl/SDS, pH 6.8
20 ml glicerol (20% final)
4 g SDS
2 ml 2-ME o 3.1 g DTT (0.2% 2-ME or 0.2 M DTT final)
1 mg de azul de bromofenol (0.001% final)
Agregar H ₂ O hasta llegar a 100 ml y mezclar.

Aliquotear y guardar a -70.

Buffer de electroforesis 5x.

15.1 g Tris base	(0.125 M final)
72.0 g glicina	(0.96 M final)
5.0 g SDS	[0.5% final]
15.1 g Tris base	(0.125 M final)

Agregar H₂O hasta completar 1litro.
No ajustar el pH. El pH de la solución es 8.3 cuando esta diluido. Guardar a 0-4°C.

Soluciones para la tinción con plata:

- Solución de ácido tricloroacético. La relación es peso volumen al 20% en agua desionidaza (disolver en poco volumen y aforar).
- Solución de glutaraldehído. Se disuelve hasta quedar al 10% v/v en agua deionizada.
- Solución de plata. Disolver nitrato de plata al 20% (0.8 g para 4 ml), agregar gota a gota a 2.1 ml de hidróxido de sodio al 0.36%, se agregan 1.4 ml de hidróxido de amonio en agitación constante, al terminar se afora a 100 ml

con agua desionizada. Nota: si la plata no se incorpora bien agregar unas gotas de hidróxido de amonio. Si la plata precipita, iniciar de nuevo toda la solución.

- Sol de revelado: 25 ml de ácido cítrico al 1% y 260 μ l de formaldehído en 500 ml de agua desionizada.
- Solución de paro: metanol al 40% y ácido acético al 10% en agua desionizada.

Soluciones para la tinción con Deep Purple:

- Solución fijadora. 7.5% de ácido acético y 10% de metanol en agua desionidazada.
- Solución Deep Purple: 125 μ l de deep purple en 25 ml de carbonato de sodio 200 mM.
- Solución de lavado. 7% de ácido acético en agua desionidaza.

REFERENCIAS

- Abbas AK, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. 2010 Chapter 2. Innate Immunity. **Cellular and molecular immunology Update 6th ed.** Philadelphia: Saunders/Elsevier.
- Aghajanian A, Wittchen ES, Allingham MJ, Garrett TA, Burridge K. 2008 **Endothelial cell junctions and the regulation of vascular permeability and leukocyte transmigration.** J Thromb Haemost. Sep;6(9):1453-60.
- Aird WC. 2007 **Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms.** Circ Res. Feb 2;100(2):158-73.
- Ali K, Bilancio A, Thomas M, Pearce W, Gilfillan AM, Tkaczyk C, Kuehn N, Gray A, Giddings J, Peskett E, Fox R, Bruce I, Walker C, Sawyer C, Okkenhaug K, Finan P, Vanhaesebroeck B. 2004 **Essential role for the p110delta phosphoinositide 3-kinase in the allergic response.** Nature. Oct 21;431(7011):1007-11.
- Artunc F, Sandulache D, Nasir O, Boini KM, Friedrich B, Beier N, Dicks E, Pöttsch S, Klingel K, Amann K, Blazer-Yost BL, Scholz W, Risler T, Kuhl D, Lang F. 2008 **Lack of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 attenuates the volume retention after treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone.** Pflugers Arch. May;456(2):425-36.
- Barreiro O, Sánchez-Madrid F. 2009 **Molecular basis of leukocyte-endothelium interactions during the inflammatory response.** Rev Esp Cardiol. May;62(5):552-62.
- Body SC. 1996 **Platelet activation and interactions with the microvasculature.** J Cardiovasc Pharmacol. 27 Suppl 1:S13-25.
- Brábek J, Mierke CT, Rösel D, Veselý P, Fabry B. 2010 **The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion.** Cell Commun Signal. Sep 7;8:22.
- Calorini L, Bianchini F. 2010 **Environmental control of invasiveness and metastatic dissemination of tumor cells: the role of tumor cell-host cell interactions.** Cell Commun Signal. Sep 7;8:24.
- Coussens LM, Werb Z. 2002 **Inflammation and cancer.** Nature. Dec 19-26;420(6917):860-7.

- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. 2009 **Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview.** J Interferon Cytokine Res. Jun;29(6):313-26.
- Estrada-Bernal A, Alcántara-Meléndez MA, Mendoza-Milla C, Ventura-Gallegos JL, Quiroz-Méndez MR, Sabanero-López M, Zentella-Dehesa A. 2003a **NF-kappaB dependent activation of human endothelial cells treated with soluble products derived from human lymphomas.** Cancer Lett. Mar 10;191(2):239-48.
- Estrada-Bernal A, Alcántara-Meléndez MA, Mendoza-Milla C, Ventura-Gallegos JL, Quiroz-Méndez MR, Sabanero-López M, Zentella-Dehesa A. 2003b **Acetylsalicylic acid impedes human endothelial cell activation mediated by soluble products derived from a human lymphoma.** Rev Oncol. 5(8):458-64.
- Eum SY, Lee YW, Hennig B, Toborek M. 2004 **VEGF regulates PCB 104-mediated stimulation of permeability and transmigration of breast cancer cells in human microvascular endothelial cells.** Exp Cell Res. Jun 10;296(2):231-44.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. **GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10** [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 11/05/2012.
- Fox IJ. 1962 **Indicators and detectors for circulatory dilution studies and their application to organ or region blood-flow determination.** Circ Res. Mar;10:447-71.
- Garcia AN, Vogel SM, Komarova YA, Malik AB. 2011 **Permeability of endothelial barrier: cell culture and *in vivo* models.** Methods Mol Biol. 763:333-54.
- Gupta GP, Massagué J. 2006 **Cancer metastasis: building a framework.** Cell. Nov 17;127(4):679-95.
- Gutman GA. 2011 Chapter 21: Immediate hypersensitivity: allergy. **Inmunology Core Notes.** School of medicine, University of California, Irvine.
- Huang Y, Song N, Ding Y, Yuan S, Li X, Cai H, Shi H, Luo Y. 2009 **Pulmonary vascular destabilization in the premetastatic phase facilitates lung metastasis.** Cancer Res. Oct 1;69(19):7529-37.
- Jacob M, Conzen P, Finsterer U, Krafft A, Becker BF, Rehm M. 2007 **Technical and physiological background of plasma volume measurement with indocyanine green: a clarification of misunderstandings.** J Appl Physiol. 2007 Mar;102(3):1235-42.

- Janeway CA. 2007 III. Efector mechanisms of immune responses. **Immunobiology** 7th ed. New York, New York. Garland Science.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011 **Global cancer statistics**. CA Cancer J Clin. Mar-Apr;61(2):69-90.
- Joyce JA, Pollard JW. 2009 **Microenvironmental regulation of metastasis**. Nat Rev Cancer. Apr;9(4):239-52.
- Jung HS, Kim MH, Gwak NG, Im YS, Lee KY, Sohn Y, Choi H, Yang WM. 2012 **Antiallergic effects of Scutellaria baicalensis on inflammation in vivo and in vitro**. J Ethnopharmacol. May 7;141(1):345-9.
- Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. 2008 **Breast cancer in Mexico: a pressing priority**. Reprod Health Matters. 16(32):113–123.
- Kopfstein L, Christofori G. 2006 **Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment**. Cell Mol Life Sci. Feb;63(4):449-68.
- Krüger K, Mooren FC. 2007 **T cell homing and exercise**. Exerc Immunol Rev. 13:37-54.
- Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY. 2009 **Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation**. Expert Rev Mol Med. Jun 30;11:e19.
- Le Bitoux MA, Stamenkovic I. 2008 **Tumor-host interactions: the role of inflammation**. Histochem Cell Biol. Dec;130(6):1079-90.
- Mamluk R, Klagsbrun M, Detmar M, Bielenberg DR. 2005 **Soluble neuropilin targeted to the skin inhibits vascular permeability**. Angiogenesis. 8(3):217-27.
- Martin D, Galisteo R, Gutkind JS. 2009 **CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex**. J Biol Chem. Mar 6;284(10):6038-42.
- Maru Y. 2007 **Which came first, tumor cells or macrophages?** Cell Adh Migr. Apr-Jun;1(2):107-9.
- Mehta D, Malik AB. 2006 **Signaling mechanisms regulating endothelial permeability**. Physiol Rev. Jan;86(1):279-367.
- Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C, Blay JY. 1998 **Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors**

- by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor.** *Blood*. Dec 15;92(12):4778-91.
- Miles AA, Miles EM. 1952 **Vascular reactions to histamine, histamine-liberator and leukotaxine in the skin of guinea-pigs.** *J Physiol*. Oct;118(2):228-57.
- Montes-Sanchez D, 2010 **Análisis de marcadores de superficie en células endoteliales tratadas con factores solubles derivados de células tumorales.** Tesis del Posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM.
- Montes-Sánchez D, Ventura JL, Mitre I, Frías S, Michán L, Espejel-Nuñez A, Vadillo-Ortega F, Zentella A. 2009 **Glycosylated VCAM-1 isoforms revealed in 2D western blots of HUVECs treated with tumoral soluble factors of breast cancer cells.** *BMC Chem Biol*. Nov 22;9:7.
- Moore FD, Tobin LH. 1942 **Studies with radioactive di-azo dyes. 1. The localization of radioactive di-brom trypan blue in inflammatory lesions.** *J Clin Invest*. Jul;21(4):471-81.
- Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. 2009 **Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization.** *Nat Rev Cancer*. Apr;9(4):274-84.
- Orr FW, Wang HH, Lafrenie RM, Scherbarth S, Nance DM. 2000 **Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis.** *J Pathol*. Feb;190(3):310-29.
- Perelmuter VM, Manskikh VN. 2012 **Pre-niche as missing link of the metastatic niche concept explaining organ-preferential metastasis of malignant tumors and the type of metastatic disease.** *Biochemistry (Mosc)*. Jan;77(1):111-8.
- Petreaca ML, Yao M, Liu Y, Defea K, Martins-Green M. 2007 **Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability.** *Mol Biol Cell*. Dec;18(12):5014-23.
- Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW. 2007 **Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall.** *Circ Res*. Aug 3;101(3):234-47.
- Sahai E. 2007 **Illuminating the metastatic process.** *Nat Rev Cancer*. Oct;7(10):737-49.
- Skov PV, Steffensen JF. 2003 **The blood volumes of the primary and secondary circulatory system in the Atlantic cod *Gadus morhua* L, using plasma bound**

- Evans Blue and compartmental analysis.** J Exp Biol. 2003 Feb;206(Pt 3):591-9.
- Steeg PS, Theodorescu D. 2008 **Metastasis: a therapeutic target for cancer.** Nat Clin Pract Oncol. Apr;5(4):206-19.
- Stefanini MO, Wu FT, Mac Gabhann F, Popel AS. 2008 **A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues.** BMC Syst Biol. Aug 19;2:77
- Stefanini MO, Wu FT, Mac Gabhann F, Popel AS. 2009 **The presence of VEGF receptors on the luminal surface of endothelial cells affects VEGF distribution and VEGF signaling.** PLoS Comput Biol. Dec;5(12):e1000622.
- Sobel AT, Branellec AI, Blanc CJ, Lagrue GA. 1977 **Physicochemical characterization of a vascular permeability factor produced by con A-stimulated human lymphocytes.** J Immunol. Oct;119(4):1230-4.
- Teshima R, Akiyama H, Akasaka R, Goda Y, Toyoda M, Sawada J. 1998 **Simple spectrophotometric analysis of passive and active ear cutaneous anaphylaxis in the mouse.** Toxicol Lett. Mar 31;95(2):109-15.
- Vennekens R, Olausson J, Meissner M, Bloch W, Mathar I, Philipp SE, Schmitz F, Weissgerber P, Nilius B, Flockerzi V, Freichel M. 2007 **Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4.** Nat Immunol. 2007 Mar;8(3):312-20.
- Weis SM. 2011 **Evaluation of VEGF-induced vascular permeability in mice.** Methods Mol Biol. 763:403-15.
- World Health Organization. 2011 **Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2010.** WHO