



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**SOBRENADANTES PROVENIENTES DE LAS CÉLULAS TUMORALES DE CÉRVIX INDUCEN
LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE CORDÓN
UMBILICAL HUMANO: POSIBLE PARTICIPACIÓN DEL TNF-ALFA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

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

PRESENTA:

JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

COMITÉ TUTOR: DRA. MA. DE LOURDES MORA GARCÍA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DRA. REBECA LÓPEZ MARURE

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHAVEZ"

MÉXICO, D.F. ENERO, 2014



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**SOBRENADANTES PROVENIENTES DE LAS CÉLULAS TUMORALES DE CÉRVIX
INDUCEN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN CÉLULAS ENDOTELIALES
DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO: POSIBLE PARTICIPACIÓN DEL TNF-ALFA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

COMITÉ TUTOR: DRA. MA. DE LOURDES MORA GARCÍA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DRA. REBECA LÓPEZ MARURE

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHAVEZ"

MÉXICO, D.F. ENERO, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de octubre de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **HERNÁNDEZ VÁZQUEZ JOSÉ MISAEL VICENTE** con número de cuenta **94152427** con la tesis titulada **"Sobrenadantes provenientes de las células tumorales de cérvix inducen la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales de cordón umbilical humano: posible participación del TNF- α "**, realizada bajo la dirección del **M en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ** :

Presidente: DR. BENNY WEISS STEIDER
Vocal: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
Secretario: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Suplente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Suplente: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 31 de octubre de 2013.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la formación académica y el apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la beca para el desarrollo de los estudios de maestría en el programa del Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM. No. de becario 199274.

A los miembros del comité tutor:

Dra. Ma. de Lourdes García Mora
Dra. Rebeca López Marure

Por su apoyo y aportaciones en la realización del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS A:

El M. en C. Luis Sánchez Sánchez por el apoyo brindado y por la dirección no sólo otorgada en el presente trabajo sino también en el ámbito profesional y humano.

Dedico este trabajo a todas aquellas personas que ponen su esperanza en el que hacer de la ciencia.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Cáncer	4
2.1. Metástasis	5
2.2 Adhesión celular	6
3. Factor de necrosis tumoral alfa	6
4. Endotelio	9
4.1. Selectinas	9
4.2. Inmunoglobulinas	10
5. Cáncer cérvico-uterino	11
6. Planteamiento del problema	14
7. Justificación	15
8. Hipótesis	16
9. Objetivo general	17
9.1. Objetivos específicos	17
10. Método	18
11. Resultados	22
12. Discusión	32
13. Conclusiones	35
14. Referencias	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Determinación del TNF- α en el medio condicionado de células HeLa.	22
2	Actividad citotóxica del medio condicionado de células HeLa sobre cultivos de células L929.	23
3	Actividad inductora de adherencia del medio condicionado de células HeLa sobre cultivos de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.	24
4	Efecto del medio condicionado de células HeLa en la expresión de la selectina E de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.	25
5	Efecto del anticuerpo antiTNF- α sobre el medio condicionado de células HeLa en la expresión de la selectina E de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.	26
6	Efecto del medio condicionado de células HeLa en la expresión de la selectina P de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.	27
7	Efecto del medio condicionado de células HeLa en la expresión de la molécula de adhesión ICAM-I de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.	28
8	Efecto del anticuerpo antiTNF- α sobre el medio condicionado de células HeLa en la expresión de la molécula de adhesión ICAM-I de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.	29
9	Efecto del medio condicionado de células HeLa en la expresión de la molécula de adhesión VCAM-I de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.	30
10	Efecto del anticuerpo antiTNF- α sobre el medio condicionado de células HeLa en la expresión de la molécula de adhesión VCAM-I de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.	31

RESUMEN

La metástasis es un proceso complejo que se presenta durante el desarrollo del cáncer, éste culmina con la migración y el establecimiento de células provenientes de un sitio de crecimiento primario hacia órganos distantes. El éxito en la colonización de nuevos órganos depende de varios eventos, las células tumorales se desprenden de la masa tumoral primaria, degradan la lámina basal, invaden el tejido subyacente, al alcanzar los vasos sanguíneos se dispersan por el torrente sanguíneo y finalmente se detienen y crecen en un órgano distante. Para el establecimiento de tumores secundarios es necesaria la presencia de varias moléculas de adhesión como las selectinas E y P así como ICAM-1 y VCAM-1 en las células endoteliales de los vasos sanguíneos. La expresión de estas moléculas de adhesión es influenciada por citocinas proinflamatorias como el TNF- α , de la que se sabe puede ser secretada por células tumorales.

En el presente trabajo se estudió el efecto de los sobrenadantes de cultivos de la línea celular HeLa, en la expresión de moléculas de adhesión celular en cultivos primarios de endotelio de vena de cordón umbilical humano. Se demuestra la presencia de TNF- α en los sobrenadantes de los cultivos de la línea celular HeLa en una concentración de 0.1524 pg/ μ g de proteína total obtenida. Los sobrenadantes de células HeLa inducen la adhesión de células monocíticas U937 a cultivos de monocapas de células endoteliales a una concentración de 160 pg/ml de TNF- α . Una concentración de 64 pg/ml de TNF- α induce la expresión de moléculas de adhesión como la selectina E, ICAM-1, VCAM-1 en células endoteliales. Al neutralizar los sobrenadantes de cultivos de células HeLa con anticuerpo antiTNF- α , se obtuvo un decremento mayor al 50 % en la expresión de estas moléculas de adhesión. Los resultados sugieren que las células tumorales pueden inducir la expresión de moléculas de adhesión que son necesarias para su establecimiento en órganos distantes.

ABSTRACT

Metastasis is a complex event during the cancer process that culminates with the migration and establishment of cancer cells from the primary tumor toward distant organs. The success of the colonization of new organs by the cancer cells depends on several events, including their detachment from the primary tumor, the degradation of the basal lamina, invasion of the subjacent tissue, cellular extravasation and the attachment and growth on distant organs. During the establishment of secondary tumors the presence of several adhesion molecules such as selectins E and P, ICAM-1 and VCAM-1 by the endothelial cells is necessary. The expression of these adhesion molecules is influenced by pro-inflammatory cytokines such as TNF- α .

In this work the effect of supernatants from cultures of the cervical cancer cell line HeLa on induction of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells primary cultures was evaluated. We showed that TNF- α was capable to induce adhesion of monocytes from the U937 cell line on endothelial cell cultures. Our results demonstrated the presence of TNF- α in the supernatants of HeLa in a concentration of 0.1524 pg/ μ g. We also demonstrate that 420 μ g of total protein from the supernatants equivalent to a concentration of 64 pg of TNF- α induced the expression of the adhesion molecules selectin E, ICAM-1 and VCAM-1 by the endothelial cells. To demonstrate that TNF- α was the responsible of the expression of the adhesion molecules, we neutralized the supernatants with an anti-TNF- α antibody. We found that the anti-TNF- α decreased up to 50% the expression of the adhesion molecules. Our results suggest that tumor cells could induce the expression of adhesion molecules that are necessary for their establishment of the tumor cells in distant organs.

1. INTRODUCCIÓN

La metástasis es la última fase de un proceso canceroso que culmina con la invasión de órganos cercanos y distantes al sitio de crecimiento del tumor primario. La metástasis es un evento clínico importante debido a la alta mortalidad de pacientes con cáncer asociada a esta última fase. Observaciones experimentales en animales, y datos clínicos humanos indican que muchas células cancerosas ganan acceso a la circulación durante la historia natural del desarrollo del cáncer. La identificación de células cancerosas en sangre y en médula ósea, han arrojado reportes de frecuencias de 30-40 % en pacientes con neoplasias de pulmón, tracto gastrointestinal y mama (Tantivejkul *et al*, 2004).

La metástasis es un proceso complejo. Para colonizar exitosamente un sitio alejado, una célula cancerosa debe completar una secuencia de pasos. Este proceso comienza en la masa tumoral primaria con la pérdida de adherencia entre células y con la membrana basal, así como la degradación de ésta mediante la acción de enzimas proteolíticas, como las metaloproteasas y serinproteasas, evento que marca el inicio de la invasión. La invasión hacia el tejido subyacente es mediada por la degradación de los componentes del tejido conectivo, y la subsecuente utilización de elementos estructurales como puntos de adhesión durante la migración. Las células tumorales invasivas alcanzan la membrana basal de los vasos sanguíneos y linfáticos, la degradan y penetran al interior de éstos, iniciándose así, una dispersión mediada por la distribución del sistema circulatorio. La detención posterior en la vasculatura de un órgano distante, donde las células tumorales se abren paso entre las células endoteliales, degradan la membrana basal y se establecen en el tejido circundante, donde habrán de sobrevivir, proliferar e inducir angiogénesis, da la pauta al establecimiento de un tumor secundario. Las interacciones entre las células endoteliales y las células tumorales, en el proceso de extravasación, es mediada por moléculas de adhesión. La cantidad de moléculas expresadas en el endotelio vascular es regulada por su activación mediante citocinas como el TNF- α (Jian-Guo, 2003).

2. CÁNCER

El cáncer es una enfermedad producida por la transformación maligna de las células, que deriva de una serie de cambios genéticos que interfieren con el control de procesos fundamentales que lleva a cabo la célula, como son: proliferación, diferenciación, y muerte celular (Hanahan and Weinberg, 2000).

Cuando la estructura y función de un tejido u órgano son modificadas, los cambios se pueden deber a alteraciones a nivel celular. Tales cambios en la célula son provocados por la acumulación de alteraciones genéticas inducidas por agentes físicos, químicos y biológicos (Yocota, 2000), tales como la radiación ultravioleta, las emisiones radiactivas y la infección recurrente con organismos patógenos, así como la exposición a compuestos químicos carcinogénicos (Weinberg, 1996). El desarrollo de una célula con crecimiento y características anormales puede generar un tumor, el cual derivará a partir de una célula que presenta alteraciones que han sido seleccionadas y transmitidas, y que provocan un descontrol en el ritmo de la división celular, así como una mejor adaptación a condiciones de bajas concentraciones en nutrientes y cambios en las características morfológicas debidas a una perturbación de los procesos de diferenciación, alterando con ello, la homeostasis del organismo (Alberts *et al*, 1994).

El desarrollo de los diferentes tipos de tumores depende del tipo de tejido en el que progresan estos sitios de crecimiento anormales, y éstos pueden ser benignos o malignos. Los tumores malignos derivan en cáncer y éstos se clasifican en sarcomas para el tejido conjuntivo y el muscular, leucemias en el tejido hematopoyético y linfoide, así como carcinomas en el tejido epitelial. El desarrollo de cáncer deriva de una célula que presenta alteraciones que han sido seleccionadas, que son transmitidas generando células con características fenotípicas diferentes de aquellas células de la cual provino la célula originaria del nuevo linaje y con las cuales guarda una correspondencia (Guevara-Pardo, 2000).

En general, el cáncer de tejidos sólidos es una enfermedad neoplásica, constituida por una masa anormal de células cuyo crecimiento se presenta sin respetar el mantenimiento de la estructura del tejido, y sin respetar la disponibilidad de espacio con respecto a las células normales vecinas.

Esta enfermedad neoplásica persiste de manera excesiva luego de cesar el estímulo que desencadenó su transformación (Fidler, 1999). El sitio de crecimiento donde empieza a emerger esta masa celular se le denomina tumor primario, el cual no ha desarrollado aun su capacidad de infiltrar, invadir o generar metástasis a diferentes tejidos u órganos (Welch *et al*, 2000). En cambio, un tumor invasivo consiste de una masa celular que ha logrado destruir la lámina basal y a través de un proceso de migración celular invade, penetra y lesiona progresivamente los tejidos adyacentes (Wienberg, 1996; Keleg *et al*, 2003). Un tumor secundario denota el desarrollo de implantes celulares, los cuales carecen de continuidad con los sitios de crecimiento primarios, ya que después de penetrar e ingresar a los vasos sanguíneos viaja a través del torrente sanguíneo llegando a colonizar otros órganos lejanos. A este tumor secundario se le denomina metastásico.

2.1. METÁSTASIS

La metástasis es la fase de culminación de un proceso neoplásico, proceso caracterizado por seis estados en los que se distinguen la adquisición de un fenotipo inmortal, una regulación anormal en la proliferación celular, crecimiento autosuficiente, evasión de la apoptosis, angiogénesis sostenida, invasión y metástasis (Cavallo *et al*, 2011).

La metástasis se define como la diseminación de células neoplásicas desde una masa tumoral primaria o secundaria, hacia el tejido de un órgano distante. Tal diseminación puede ser vía vasos sanguíneos y linfáticos o por migración a través de las cavidades corporales (Eccles and Welch 2007). Si bien todas las células capaces de desarrollar metástasis son neoplásicas, no todas las células de una masa tumoral primaria presentan la misma capacidad de dispersarse y colonizar sitios lejanos, esto se debe a que dentro de un sitio de crecimiento primario se presentan subclonas, que derivando del linaje original que da inicio al sitio de crecimiento, han ganado características distintivas que les permiten desprenderse de la masa tumoral, migrar y fundar sitios de crecimiento secundarios (Hunter, 2004). Las células neoplásicas deben ganar la habilidad de romper las barreras anatómicas del tejido de origen, lo cual se consigue con la secreción de proteasas que facilitan el proceso de invasión de los tejidos subyacentes. La migración involucra un cambio en el perfil de expresión de moléculas de adhesión, un cambio de moléculas que proporcionan uniones firmes por moléculas que facilitan puntos de adhesión dinámicos los que son usados por la célula para migrar en el tejido adyacente (Takeichi, 1993; Zavala-Zendejas y Rendón Huerta, 2008). Las células neoplásicas se desplazan hacia el vaso sanguíneo o linfático más cercano, tal movimiento está gobernado por el gradiente de concentración de quimiocinas que difunden desde estos vasos (Cavallaro and Christofori, 2001), al alcanzar el tejido circundante de éstos, degrada la matriz extracelular y se abre paso entre las células endoteliales para introducirse hacia el interior del vaso, proceso denominado intravasación (Voura *et al*, 1998), la dispersión se da por el torrente sanguíneo y la detención se presentará de acuerdo al ambiente tisular de los órganos distantes. Se ha postulado que en la detención de estas células neoplásicas puede darse una obstrucción de los capilares por estas células, en donde las interacciones de adhesión con las células endoteliales propicia el proceso de transmigración endotelial hacia el tejido subyacente (Burdick *et al*, 2001), sin embargo también se ha propuesto una interacción entre células endoteliales y neoplásicas en la que intervienen procesos de adhesión, característicos del reclutamiento de leucocitos durante la inflamación; esta última postura propone un patrón de colonización en la metástasis definido por el ambiente de cada órgano (Leong *et al*, 2006) en el cual influyen las moléculas de adhesión (Cavallaro and Christofori, 2001) y receptores de quimiocinas (Ben-Baruk, 2008) expresados en su vasculatura, así como el estado de inflamación (Orr *et al*, 2000; Jian-Guo, 2003; Wu *et al*, 2001). Una vez que las células tumorales se han detenido en el torrente sanguíneo por interacciones de adhesión con las células endoteliales, éstas se extienden sobre la pared del vaso y se abren paso entre las uniones de las células endoteliales, semejando un proceso de diapédesis (Miles *et al*, 2008); la salida de las células neoplásicas del torrente sanguíneo se denomina extravasación. Una vez que la célula ha salido de la vasculatura se establece en el tejido subyacente y

si las condiciones son propicias ha de sobrevivir y proliferar, con lo que el proceso de colonización de sitios distantes dará paso a puntos secundarios de crecimiento (Sceneay *et al*, 2013).

2.2. ADHESIÓN CELULAR

La adhesión de las células tumorales en la circulación, al endotelio de los vasos sanguíneos, es un paso crítico en el establecimiento de tumores secundarios. Las células tumorales, utilizan las funciones adhesivas de moléculas de adhesión que participan en el reclutamiento de leucocitos, durante una respuesta inflamatoria. Existen citocinas que potencian la metástasis, actuando sobre células endoteliales, aumentando la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 (Simiantonaki *et al*, 2002) , VCAM-1, selectinas E y P (Vidal-Vanaclocha *et al*, 2000) e integrinas (Taichman *et al*, 1991); citocinas como TNF- α e IL-1 β aumentan la incidencia de metástasis, ya que pueden inducir la expresión de estas moléculas de adhesión, en pulmón y hígado, así como en células tumorales de melanoma, mama y colon, además de aumentar la adhesión de células tumorales a monocapas de endotelio de vasos capilares de cerebro, pulmón, hígado, riñón y vena de cordón umbilical humano (Mendoza *et al*, 2001; Brodt *et al*, 1997).

Además de las citocinas inflamatorias mencionadas, las cuales pueden ser secretadas por las mismas células tumorales (Himeno *et al*, 1990; Hazelbag *et al*, 2001; Desai *et al*, 2013), se tienen otras moléculas que inducen la misma respuesta en las células endoteliales. El antígeno carcinoembrionario (CEA) producido por carcinomas colorectales, participa en el desarrollo de la metástasis (Hermunen *et al*, 2013). La proteína E7 (HPV-16) secretada por carcinomas de cérvix, induce activación de endotelio de capilares cervicales, no teniendo efecto sobre endotelio de vena de cordón umbilical humano (D'Anna *et al*, 2001).

3. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) fue descrito como agente inductor de necrosis hemorrágica en tumores (Carswell *et al*, 1975). Inicialmente se pensó que el TNF- α actuaba únicamente sobre tumores, pero, posteriormente se identificaron otros blancos celulares sobre los cuales presenta otras actividades biológicas. El TNF- α es una citocina pleiotrópica que posee propiedades inflamatorias, inmunorreguladoras, antitumorales, mitógenas y de diferenciación, entre otras (Robache-Gallea *et al*, 1995; Wajant *et al*, 2003).

El TNF- α pertenece a la familia de las citocinas (moléculas de bajo peso molecular, normalmente entre 15-30 kDa, constituidas por 120-180 aminoácidos). Existen dos tipos de TNF, el TNF- α y TNF- β . El TNF- α , identificado por su actividad necrótica en tumores, es producido por macrófagos activados, y es la principal citocina elaborada en respuesta a infecciones bacterianas. El TNF- β es producido por linfocitos activados. Ambas formas presentan propiedades y funciones muy similares (Abbas and Linchtman, 2003).

El gen del TNF- α se localiza en el complejo principal de histocompatibilidad, en el brazo corto del cromosoma 6. El TNF- α es una glicoproteína de 157 aminoácidos de 17 kDa, aislada de la línea promielocítica HL-60. Se ha encontrado una forma de 25 kDa unida a la membrana plasmática, este preTNF- α posee una secuencia de 76 residuos de aminoácidos altamente hidrofóbicos, que le sirven para anclarse en la membrana para posteriormente ser liberado como una forma de 17 kDa (Kriegler *et al*, 1988). La forma activa es un homotrímero de 45 kDa con un arreglo de láminas β -plegadas antiparalelas. El TNF- α es sensible a la acción de las proteasas perdiendo su actividad biológica rápidamente, lo que sugiere una estructura terciaria poco compacta (Arakawa and Yphantis, 1987).

El TNF- α es una citocina multifuncional que ha sido caracterizada por su actividad proinflamatoria e inmunorreguladora. La fuente principal de TNF- α son las células asesinas naturales (NK), linfocitos T, linfoblastos, células tumorales de mama, ovario (Garret *et al*, 1987; Goeddel *et al*, 1986) y células epidermales (Hazelbag *et al*, 2001), no obstante, es producida en altas concentraciones por monocitos y macrófagos. El TNF- α induce una gran variedad de respuestas celulares, promueve o inhibe la proliferación celular, induce citotoxicidad e induce o previene la diferenciación celular. *In vitro* estimula el crecimiento de fibroblastos diploides normales, sin embargo, en líneas transformadas inhibe la proliferación e induce citotoxicidad (Lee J *et al*, 2009; Malejczyk *et al*, 1992).

El TNF- α induce muerte por necrosis de varios tumores malignos y benignos e inclusive puede inducir apoptosis (Mocellin *et al*, 2005; Powell *et al*, 1998). El TNF- α es capaz de inhibir el crecimiento de células epiteliales de cérvix humano normal, sin embargo, estimula la proliferación de líneas cervicales humanas transfectadas con el virus del papiloma humano tipos 16 y 18 (VPH-16, VPH-18). Además, en líneas celulares de carcinoma cervical humano también estimula su proliferación. Esta respuesta proliferativa también se ha observado en células leucémicas megacarioblásticas (Gaiotti *et al*, 2000).

El TNF- α se enlaza a receptores específicos presentes en las membranas celulares de la mayoría de los tejidos. Existen dos tipos de receptores que enlazan el TNF- α con alta afinidad, uno de 55 kDa (p55) o receptor I (TNFR-I) y otro de 70-80 kDa (p75) o receptor II (TNFR II), a estos receptores también se une con gran afinidad la linfoxina alfa (L α), un homotrímero de TNF- β . El TNFR I tiene un papel crítico en la muerte celular mediada por el TNF- α , por lo que se considera el encargado de regular la citotoxicidad, mientras que el TNFR II tiene un papel decisivo en la defensa del organismo contra microorganismos patógenos (Wajant *et al*, 2003).

El estudio de la actividad biológica del TNF- α ha reportado actividad antitumoral presente en el suero de los animales con infecciones sistémicas, es un mediador primario endógeno, responsable de la patogénesis que acompaña a la infección sistémica, y que sirve como mediador crucial en el choque séptico o endotóxico.

La secuencia de sucesos que siguen a la interacción del TNF- α con sus receptores se puede dividir en cuatro etapas. Primero, formación de complejos entre el TNFR I o II, las proteínas acopladoras FADD y TRADD, y proteínas cinasas como RIP o proteasas de la familia de las caspasas como FLICE. Es la etapa donde se activan más de una ruta de señalización. Una asociada con la muerte celular por apoptosis que depende de FLICE, y una asociada a cambios de expresión genética que depende de RIP. Segundo, un aumento en el recambio de esfingolípidos de membrana que da origen a los segundos mensajeros como la ceramida. Tercero, la rápida activación de la cascada de señalización en la que participan proteínas cinasas como JUNK y la proteína cinasa dependiente de ceramida CAPK, proteínas fosfatasa del tipo 2a y proteasas solubles de la familia de la convertasa de la interleucina 1 (ICE). Cuarto, la activación de transcripción mediada por factores de transcripción como NF- κ B y AP-1 que llevan a cambios en la expresión génica. Por último, paralelo a estos cambios de la fisiología celular se produce un aumento en la producción de radicales libres y consecuentemente estrés oxidativo (Wajant *et al*, 2003).

La actividad proinflamatoria del TNF- α en las células endoteliales, generalmente involucra la síntesis de nuevas proteínas. Estos cambios son iniciados por los factores de transcripción, NF- κ B y la proteína activadora (AP-1), necesarios para la inducción de la transcripción de las moléculas de adhesión del endotelio. Los genes de la selectina E, ICAM-1 y VCAM-1 contienen secuencias en sus extremos 5' que unen NF- κ B y AP-1 (Raab *et al*, 2002; Pober, 2002).

En células endoteliales la señalización iniciada por el complejo TNF- α /receptor, el cual une a la proteína de dominio de muerte asociada al receptor del TNF (TRADD) a través de interacciones de dominios de muerte (DD) expresados en ambas proteínas. La unión de TRADD inicia el reclutamiento de la proteína de interacción con el receptor (RIP), y de la proteína asociada al receptor TNF (TRAF2). La RIP se une a TRADD por un dominio DD y TRAF2 se une al dominio N-terminal de TRADD, contribuyendo a la activación de NF- κ B al reclutar o estabilizar las interacciones de RIP con sus efectores. Tanto el NF- κ B como la AP-1 son activados por miembros de las proteínas cinasas MEKK, éstos pueden fosforilar y activar un complejo enzimático citosólico denominado cinasa (IKK) del inhibidor citosólico de κ B (I κ B). Al ser fosforilado el I κ B, en respuesta al TNF- α , es ubiquitinizado y degradado en el proteosoma. El NF- κ B libre se desplaza del citosol al núcleo y activa la transcripción. En el endotelio de vena umbilical humana el NF- κ B está formado de homodímeros o heterodímeros de NF- κ B1 (p50), Rel A (p65) y c-Rel (Chandrasekharan *et al*, 2007; Wajant *et al*, 2003).

La célula endotelial juega un papel importante en la regulación de la permeabilidad de los vasos sanguíneos, consecuentemente cambios en la función de estas células modifican las características morfológicas y funcionales de la vasculatura (Detmar *et al*, 1990). Las células endoteliales presentan los dos receptores para el TNF- α (Slowik *et al*, 1993) por lo que se asume que los efectos del TNF- α sobre las células endoteliales están mediados a través de ellos. El TNF- α promueve el proceso proinflamatorio y de neovascularización, es capaz de inducir cambios en la distribución de los filamentos de actina, cambios que podrían estar asociados a los cambios morfológicos necesarios para permitir la extravasación de los linfocitos. Por otro lado el TNF-

α induce la expresión del factor procoagulante del tejido (TF), el inhibidor del activador de plasminógeno tipo I (PAI) y del factor activador de plaquetas (PAF); por otra parte, regula la trombosmodulina, por lo que previene la formación de la proteína C. También es capaz de inhibir la producción del activador de plasminógeno de tejidos (t-PA), por lo que altera los mecanismos anticoagulantes (Pober, 2002).

4. ENDOTELIO

Las células endoteliales recubren el interior de los vasos sanguíneos y constituyen la interfase física y fisiológica entre el torrente sanguíneo y los tejidos, funcionando como transmisoras e intermediarias de las señales entre los dos medios. No sólo son elementos estructurales de los vasos, que proporcionan una superficie antitrombogénica, sino que además participan en numerosas funciones metabólicas, incluyendo la coagulación y la trombosis, el control de la dilatación vascular y la presentación de antígenos. El endotelio está constituido de una población heterogénea de células que no sólo varía de órgano a órgano, sino también, en vasos de distintos calibres dentro de un mismo órgano (Bazzoni and Dejana, 2004).

Las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos están en un estado latente con una actividad muy baja (Risau, 1995), a estas células se les identifica como de fenotipo constitutivo, sin embargo, éste no es permanente, ya que puede cambiar cuando el microambiente lo requiere. Fisiológicamente las células endoteliales salen de su estado latente cuando son activadas por diversos estímulos. Esta activación está asociada a diversos cambios fenotípicos que les permiten adaptarse a las funciones locales requeridas, como la angiogénesis, en la cual, las células se separan de los vasos para iniciar una cascada morfogenética que lleva a la formación de nuevos vasos sanguíneos con células endoteliales. Otro estado de activación involucra la sobre expresión de moléculas de adhesión como las selectinas E y P, moléculas de adhesión intercelular o de adhesión de células vasculares (ICAM-1, VCAM-1), durante un estado de inflamación, tal activación es inducida por citocinas como el TNF- α o interleucinas como IL-1, IL-6 o IL-10, en endotelio microvascular principalmente. Pese a la heterogeneidad entre las células endoteliales, los mecanismos de activación y regulación de las moléculas de adhesión es común (Cook-Mills and Deem, 2005; Pober, 2002; Raab *et al.*, 2002).

4.1. SELECTINAS

La familia de las selectinas está formada por tres moléculas de superficie: selectina L, selectina E y selectina P. Éstas comparten una característica particular, un dominio de lectina dependiente de calcio en el extremo amino terminal, un dominio semejante al del factor de crecimiento epidérmico y dos a nueve secuencias consenso repetitivas (SCR), que son unidades homólogas a dominios encontrados en las proteínas complementarias. En el reconocimiento de los ligandos de las selectinas participa una molécula de carbohidrato. La presencia de un dominio de lectina en el extremo N terminal de la selectina facilita el acceso a las moléculas de carbohidratos

presentes en los leucocitos. Las interacciones lectina carbohidrato son dependientes de calcio. La gran variedad de estructuras determinadas por los carbohidratos contribuyen al alto grado de especificidad de las interacciones célula-célula (McEver *et al*, 1995).

La expresión de la selectina L está limitada a las células hematopoyéticas, mientras que la selectina P se encuentra constitutivamente en las plaquetas y en las células endoteliales. La selectina E está presente en las células endoteliales.

La expresión de la selectina E es inducida por citocinas como, la IL-1 β , el TNF- α , el interferón γ (INF- γ) y los lipopolisacáridos (LPS) durante el proceso inflamatorio (Zak *et al*, 2000).

Durante el inicio de la extravasación de leucocitos, el “rolling” es el primer contacto entre las células en el torrente sanguíneo y las células del endotelio activado, asegurando su adhesión a la pared del vaso, ésto es mediado por la interacción de las selectinas E y P con sus contrarreceptores, proteoglicanos presentes en las células reclutadas; de igual manera se ha descrito que células tumorales presentes en sistemas de flujo dinámico sobre monocapas de endotelio, usan el mismo mecanismo para disminuir velocidad y mantenerse adheridas al endotelio vascular (Brodt *et al*, 1997; Jian-Guo, 2003.)

4.2. INMUNOGLOBULINAS

La superfamilia de receptores de inmunoglobulinas está definida por la presencia de dominios de inmunoglobulinas, que está compuesto de 70 a 100 aminoácidos. Este grupo de receptores es muy variado y comprende desde receptores solubles o receptores unidos a membrana hasta moléculas de adhesión de una sola cadena entre las que se encuentran la ICAM-1 la VCAM-1.

La distribución de la ICAM-1 y la VCAM-1 está asociada a la función de adhesión específica célula-célula. La ICAM-1 se expresa constitutivamente sólo en algunos tipos celulares. En lugares donde se presenta una respuesta inflamatoria, se induce la ICAM-1 de manera transitoria en una variedad de tipos celulares. Los contrarreceptores a los cuales se unirá, forman parte de la familia de las integrinas, que se encuentran expresadas en la superficie de los leucocitos: LFA-1 y Mac-1. LFA-1 se une al primer dominio de inmunoglobulina mientras que Mac-1 se une al tercero. Otros miembros de esta familia son la ICAM-2, expresada constitutivamente en células endoteliales y sanguíneas, ICAM-3 e ICAM-R.

La expresión de la VCAM-1 se induce por algunos estímulos similares a los que inducen la ICAM-1, aunque la expresión de VCAM-1 puede ser selectivamente inducida por la IL-4, además funciona como receptor para los antígenos de superficie VLA-4 en los leucocitos.

Otra molécula de esta superfamilia de las inmunoglobulinas es la molécula de adhesión plaqueta-endotelio (PECAM-1 o CD31), que contiene seis dominios homólogos de inmunoglobulinas y secuencias de unión de proteoglicanos (Meagar, 1999).

Estos receptores de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas están involucrados en la retención con firmeza de las células que iniciaron el “rolling” sobre la pared del endotelio. Si las selectinas propician la disminución de la velocidad, las inmunoglobulinas de adhesión detienen totalmente estas células; sus contrarreceptores, las integrinas, inducen la remodelación del citoesqueleto de las células detenidas provocando su aplanamiento sobre la pared del vaso, así como la formación de filipodios o lamelipodios que se abren paso entre las células endoteliales para la extravasación (Juliano, 2002; Muller, 2003; Simon and Green, 2005). De igual manera, se ha descrito que células tumorales utilizan el mismo mecanismo para una detención total y adhesión firme en condiciones de flujo, así como el inicio de los eventos de extravasación (Okahara *et al*, 1994).

5. CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

Entre los tumores malignos sólidos, la formación de lesiones en la región cérvico-uterina es la segunda causa de muerte en mujeres por cáncer tanto a nivel mundial como nacional (INEGI, 2011).

Los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer cérvico-uterino (CaCU) involucran el inicio a edad temprana de relaciones sexuales, haber tenido varias parejas sexuales, el haber padecido enfermedades de transmisión sexual, hábitos de higiene deficientes, consumo de tabaco, alcohol o anticonceptivos hormonales son las principales causas en la adquisición, manifestación y progresión del CaCU. Los eventos tisulares en la progresión del cáncer cervical se clasifican en los diferentes estadios de esta enfermedad. Se inicia con el cáncer *in situ* denominado Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), donde se presentan varios estados de desarrollo. La NIC-I es una lesión intraepitelial de bajo grado y es una displasia leve. La NIC-II es una displasia moderada y junto con la NIC-III, displasia grave, son consideradas lesiones intraepiteliales de alto grado. Presentándose de ésta manera un cáncer *in situ*. Posteriormente se pasa a un estado de cáncer invasor denominado cáncer metastásico (de Vita *et al*, 1993).

El carcinoma de cérvix, en un 99 %, es originado por la infección del Virus de Papiloma Humano (VPH) y en particular los tipos 16 y 18 acumulan el 70 % de los casos de este cáncer, el resto de los casos presentan VPH 31 y 45 y solo un mínimo porcentaje (1 %) del CaCU es negativo a VPH. No obstante, la infección del VPH no es causa suficiente para la malignidad, se necesita de la colaboración de cofactores para la progresión y persistencia de la infección. Éstos incluyen factores del hospedero como respuesta inmunológica, influencia de hormonas y otras infecciones transmitidas sexualmente (Muños & Bosch, 1997). De esta forma la asociación de la infección con el VPH y el desarrollo de cáncer no es absoluta, ya que la mayoría de las mujeres infectadas con este virus no padecen cáncer cervical (Motoyama *et al*. 2004).

Actualmente se han descrito más de 130 tipos diferentes del VPH que son catalogados como de bajo riesgo —tipos cuya infección no provoca patologías malignas— y de alto riesgo —aquellos tipos que provocan malignidad. Treinta de los tipos de VPH identificados están relacionados con lesiones anogenitales (Taja-Chayeb *et al*, 1996). Tales VPH son específicos de tejido y especie, ya que pueden infectar epitelio húmedo o seco de diferentes mamíferos (Guzmán-Rojas *et al*, 1998). La infección por VPH en los epitelios escamosos, secos y húmedos, se inicia en las células basales del epitelio y es en este lugar en donde se tiene el desarrollo del ciclo de propagación del VPH, el cual está relacionado al programa de diferenciación de la célula hospedera con la producción de partículas virales maduras restringida a las células suprabasales diferenciadas. La infección por VPH se presenta a través de microheridas en el epitelio que exponen a las células de la lámina basal a la infección viral. Las células de la lámina basal son células que están en constante división y proveen un reservorio de células para la región suprabasal. La infección viral activa la maquinaria celular para producir de 20 a 100 copias extracromosomales del ADN viral por célula. Entre las primeras proteínas virales expresadas se tienen factores de replicación como las proteínas E1 y E2 que forman complejos que se unen a secuencias en el origen de replicación viral y que utilizan las polimerasas celulares y proteínas accesorias para mediar la replicación. Las proteínas E4 y E5 se piensa están involucradas en la regulación de funciones virales posteriores. Las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo actúan como oncoproteínas que han de provocar que la célula hospedera entre continuamente al ciclo celular y se divida. Como el VPH infecta células basales que se dividen regularmente, el genoma viral es transmitido a las células hijas, una de las cuales ha de permanecer en la lámina basal y la otra ha de migrar hacia los estratos superiores al tiempo que experimenta diferenciación. En un epitelio normal con células no infectadas, las células salen del ciclo celular conforme se han alejado de la lámina basal, al tiempo que se presenta una pérdida del núcleo. Por el contrario, todas las células infectadas con VPH conservan la propiedad de dividirse aún en los estratos suprabasales. Las proteínas L1 y L2 son ensambladas posteriormente y forman espontáneamente una cápside icosaédrica que contendrá al virión que ha de ser liberado de las capas superiores del epitelio (Longworth & Laimins, 2004).

La caracterización de estirpes celulares malignas de esta región cérvico-uterina ha llevado a identificar líneas celulares que difieren en estado clínico, como por ejemplo HeLa (Adenocarcinoma IVB metastásico), línea celular que presentan infección con VPH-18, además existen líneas celulares infectadas con VPH-16 como SiHa y CaSki y otras líneas celulares negativas al VPH como C33A. La expresión de un fenotipo maligno depende de la expresión de los oncogenes E6 y E7 del VPH para mantener las características de immortalización y transformación celular (López-Saavedra y Lizano-Soberon, 2004). Las líneas celulares que presentan infección con el VPH y que provienen de CaCu presentan una transformación e immortalización relacionada a la interferencia que realizan las proteínas virales E6 y E7 con las proteínas celulares supresoras de tumor p53, p73 y RB, impidiendo la detención del ciclo celular en los puntos de restricción y esquivando la verificación de la integridad genómica, ocasionando la acumulación de alteraciones a este nivel (Longworth & Laimins, 2004).

Se ha determinado que diferentes líneas celulares de CaCu tiene la capacidad de responder de forma diferencial a estímulos inducidos por citocinas, es el caso del TNF- α que puede inducir muerte

celular a altas concentraciones (Pucci *et al*, 2009) o promover proliferación a bajas concentraciones (Woodworth *et al*, 1995), además existe reportes que demuestran que células tumorales provenientes de cáncer pueden secretar citocinas como TNF- α (Flores-Guzman, 2003) y responder a ésta promoviendo la migración celular (Diacuno *et al*, 2008).

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCu es la segunda causa de muerte de mujeres mexicanas que padecen cáncer, y la metástasis es la última fase clínica de pacientes con estado avanzado de cáncer. En este proceso de metástasis que permite el establecimiento de tumores secundarios, la participación de las moléculas de adhesión expresadas en el endotelio vascular, juegan un papel importante en la interacción con células tumorales que viajan por el torrente sanguíneo. Las moléculas de adhesión como las selectinas E y P, así como ICAM-1 y VCAM-1 se expresan en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano por tratamiento de citocinas proinflamatorias como el TNF- α . Se conoce que líneas celulares de CaCu inducen la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales; sin embargo, no es claro el mecanismo por el cual se presenta tal efecto, por lo que en este trabajo se estudió el papel del TNF- α presente en los sobrenadantes de cultivos de células HeLa, en la expresión de moléculas de adhesión selectinas E y P, ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.

7. JUSTIFICACIÓN

El CaCu es la segunda causa de muerte de mujeres mexicanas que padecen cáncer. El 99 % de los casos de CaCu están asociados al virus del papiloma humano tipo y solo un bajo porcentaje, 1-2 % son neoplasias no asociadas a este virus.

En la historia clínica, el desarrollo de la metástasis, es un evento de vital relevancia, dada la alta mortalidad asociada a este estado de desarrollo del cáncer. La comprensión de los eventos celulares y moleculares asociados a la metástasis, es necesaria para la correcta comprensión y planeación de estrategias de tratamiento, por lo que es obligado determinar la participación de citocinas, como el TNF- α , en la actividad inductora de la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, provocada por células tumorales de CaCu.

8. HIPÓTESIS

Durante la metástasis, las células tumorales han alcanzado los vasos sanguíneos y son transportadas por el sistema circulatorio hasta su implantación en un órgano lejano. La detención de estas células en el torrente sanguíneo está mediada por moléculas de adhesión presentes en las células endoteliales. Citocinas como el TNF- α inducen la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, además sobrenadantes de cultivos de células tumorales de CaCu inducen la expresión de moléculas de adhesión en endotelios, y se ha encontrado que líneas celulares de cáncer cérvico-uterino, como HeLa, producen TNF- α . De acuerdo a lo anterior, se espera que sea el TNF- α la citocina responsable de la actividad inductora de la expresión de las moléculas de adhesión selectinas E y P, ICAM-1 y VCAM-1, en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano tratadas con sobrenadantes de cultivos de la línea celular HeLa.

9. OBJETIVO GENERAL

Determinar si las células tumorales de CaCu, HeLa, son capaces de inducir la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales de cordón umbilical humano y la posible participación del TNF- α .

9.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si la línea celular tumoral del cérvix HeLa, secreta TNF- α .
2. Determinar si el sobrenadante proveniente del cultivo de la línea celular HeLa induce activación endotelial.
3. Determinar si el sobrenadante proveniente del cultivo de la línea celular HeLa induce la expresión de moléculas de adhesión (Selectina E, Selectina P, VCAM-I e ICAM-I) en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.

10. MÉTODO

Cultivo de células HeLa y obtención de medio de cultivo condicionado. Las células provenientes de CaCu HeLa, se sembraron en cajas de Petri de cristal de 100 mm (Pirex USA), en 10 ml de medio RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside), sin rojo de fenol, al 10 % de suero fetal bovino (SFB) desactivado a 56 °C por 30 minutos (Gibco BRL). Los cultivos fueron mantenidos a 37 °C, 5 % de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en una incubadora (Nuair Autflow, US).

Para la obtención de medios de cultivo condicionados libres de suero (MC), se sembraron 5X10⁶ células por caja Petri de cristal en 10 ml de RPMI-1640 al 5 % de SFB por 24 h. Posteriormente al cultivo se le realizaron 5 lavados con buffer salino de fosfatos conteniendo Ca²⁺ y Mg²⁺ (PBS) y se incubó por 48 h más en RPMI-1640 sin SFB. Los sobrenadantes fueron colectados y centrifugados a 2 000 rpm y almacenados a -4 °C en tubos cónicos de plástico de 50 ml (CORNING, US). Los cultivos se utilizaron hasta en tres resiembras para la obtención de medios condicionados.

Los medios de cultivo congelados fueron liofilizados hasta sequedad utilizando un liofilizador Speed Vac (SAVANT AES2000). El liofilizado se dializó en PBS a concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75 y 1 X, en un litro de cada concentración por 12 h cada una; se utilizó una membrana para diálisis con poro de 1 kDa (SPECTRA POOR MWCO 1000). Se recuperó el dializado y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min a 4 °C, el sobrenadante fue esterilizado usando filtros para jeringa de 0.22 µm (MILLIPORE, US) y se fraccionó en alícuotas de 200 µl en tubos cónicos de 0.6 ml (CORNING, US) y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Se generaron 10 litros de medio de cultivo condicionado de los cuales, después de la liofilización y diálisis se obtuvo un volumen de 15 ml.

Cuantificación de proteínas. La concentración de proteínas del medio condicionado de la línea celular HeLa se determinó por el método de Bradford. Primero se realizó una curva patrón de albúmina (Sigma Chemical Co), utilizando las concentraciones de 1, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 250 µg/ml en PBS; 1 ml por tubo. A cada tubo se le extrajo 200 µl los cuales se sustituyeron por 200 µl de reactivo de Bradford (BioRad US). El mismo procedimiento se realizó para las muestras de los medios condicionados, 1, 5 y 20 µl de la muestra en 1 ml de volumen total de PBS. Los tubos fueron agitados vigorosamente y el contenido fue vertido en una celda de plástico de 1 ml. La absorbancia se determinó con un espectrofotómetro a 590 nm (ELx800 BIO-TEK INSTRUMENTS, INC, US). El blanco contempló 800 µl de PBS y 200 µl de reactivo de Bradford. La concentración de proteína del medio condicionado de HeLa, se calculó con la curva patrón.

Cuantificación del TNF- α por la técnica de ELISA. Del medio condicionado de células HeLa se tomó el volumen 5 y 20 μ l correspondiente a 105 y 420 μ g de proteína total, fueron diluidos en un volumen total de 50 μ l de solución amortiguadora de carbonatos (0.1 M, pH 9.5) y agregados a los pozos, en una placa de 96 pozos de fondo plano (Nunclon, Dinamarca) por 12 h a 37 °C. De igual manera se agregaron 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 ng de TNF- α en 50 μ l de solución amortiguadora de carbonatos. Al término de este tiempo se realizaron tres lavados con PBS, se adicionó solución bloqueadora (PBS-albúmina sérica bovina al 2 %) incubando a 37 °C por 1 h. Se lavó 3 veces con PBS/Tween 20 (0.1 % v/v) y se agregó el anticuerpo primario, 1 μ g/ml de antiTNF- α , se incubó a 37 °C por 1.5 h. Se realizaron tres lavados con PBS/tween 20. Se agregó solución bloqueadora y se incubó a 37 °C por 0.5 h y nuevamente se lavó en tres ocasiones con PBS/Tween 20. Se agregó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1 μ l de anticuerpo en 40 000 μ l de PBS) y se incubó a 37 °C por 1 h, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS/Tween 20 y se añadió el sustrato (H₂O₂ 30 % y OPD en amortiguador de citratos), 100 μ l por pozo y se dejó en la oscuridad por 10 min. La reacción se detuvo agregando 25 μ l de ácido sulfúrico (2.5 N) por pozo. La cuantificación del color desarrollado se realizó en un lector de placas para ELISA (Tecan Spectra Image).

Actividad citotóxica del TNF- α . Se sembraron 1X10⁴ células L929 por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, en RPMI-1640 al 10 % de SFB por 12 h. Se substituyó el medio de cultivo por medio fresco conteniendo 0.01, 0.1, 1, 5, 10 y 15 ng/ml de TNF- α y 0.5 μ g/ml de actinomicina D, así como 210, 315, 420, 840 y 1050 μ g de proteína del medio condicionado de células HeLa y 0.5 μ g/ml de actinomicina D. El cultivo se incubó por 16 h. Los controles contemplan PBS, actinomicina D y TNF- α . La medición del efecto citotóxico se realizó utilizando una tinción con cristal violeta.

Al cabo de las 16 h se retiró el medio de cultivo, la placa se dejó secar al aire y se le agregó 50 μ l de glutaraldehído al 1.1 % (SIGMA, US) en cada pozo por 10 min. Se retiró el fijador, se dejó secar al aire y se adicionó 50 μ l de colorante cristal violeta al 0.1 % en solución amortiguadora de ácido fórmico (J.T. BAKER) durante 20 min, en agitación. Después de la tinción, se lavó la placa de cultivo con agua desionizada o bidestilada. Una vez eliminado el exceso de colorante de los pozos, se dejó secar al aire. Posteriormente se añadió 50 μ l de ácido acético al 10 % (J.T. BAKER), dejando en agitación durante 20 min. La lectura de absorbancia se realizó en un lector de placas para ELISA (Elx800; Bio-Tek) a 570 nm.

Obtención de células endoteliales. Las células endoteliales se obtuvieron a partir de cordones umbilicales humanos provenientes de partos eutócicos y cesáreas de acuerdo al procedimiento descrito por Jaffe (1973). Los cordones fueron colectados y transportados en PBS. Los cordones fueron lavados con PBS y limpiados con gasas estériles para eliminar el

exceso de sangre externa. Se canuló la vena umbilical y se lavó con PBS para la eliminación de coágulos sanguíneos, posteriormente la vena fue sometida a disgregación con tripsina (0.05 % en PBS) durante 15 min a 37 °C. El cordón fue masajado en toda su longitud para facilitar el desprendimiento de las células endoteliales. La solución disgregante fue colectada y centrifugada a 1000 rpm por 10 min. Las siembras se realizaron en medio de cultivo M199 (GIBCO, US) al 1 % de glutamina (GIBCO, BRL), 0.1 mg/ml de factor de crecimiento endotelial (SIGMA, US), 0.1 mg/ml de heparina (SIGMA, US) y 10 % de SFB. Los cultivos prosperaron hasta un 70 % de confluencia en cultivos de propagación.

Para la formación de monocapas de células endoteliales, se sembraron en placas de cultivo de 48 pozos 2.5×10^5 células en 500 μ l de medio de cultivo M199 al 1 % de glutamina, 0.1 mg/ml de factor de crecimiento endotelial, 0.1 mg/ml de heparina y 10 % de SFB y se incubó por 12 h.

La activación de las monocapas de células endoteliales se realizó sustituyendo el medio de cultivo por 250 μ l/pozo de medio fresco complementado con el TNF- α [10 ng/ml (SIGMA, US)], medio condicionado de células HeLa (1050 μ g/ml de proteína total equivalente a 160 pg de TNF- α), medio condicionado más antiTNF- α [0.18 μ g/ml (SIGMA, US)], y al control no se agregó factor de activación.

Cultivo de células U937. Las células U937 fueron mantenidas en RPMI-1640 10 % SFB. Las resiembras se realizaron retirando 9/10 del volumen de cultivo, que fue centrifugado a 1500 rpm, resuspendido en medio fresco y la siembra se realizó en cajas que aún contienen un remanente de células a una densidad de 2×10^5 células/ml. El cultivo se mantuvo a 37 °C, 5 % de CO₂ y humedad a saturación. Para realizar el marcaje con [³H]-timidina (Amersham) los medios de cultivo son suplementados con 1 μ Ci/ml durante 48 h. Las células marcadas son lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en medio M199 al 10 % SFB y 0.1 mg/ml de factor de crecimiento endotelial, para su utilización en ensayos de adhesión.

Ensayos de adhesión celular. Las monocapas de células endoteliales cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos, 2.5×10^5 células/pozo, fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α , 1050 μ g/ml de medio condicionado de la línea celular HeLa equivalente a 160 pg de TNF- α , antiTNF- α 3.2 μ g/ml por 1 h antes de agregar el medio condicionado de células HeLa 1050 μ g/ml, el control no fue estimulado para su activación pero se le realizó un cambio de medio fresco. Se agregaron células U937 previamente marcadas con [³H]-timidina, 5×10^5 células/250 μ l. El cocultivo se mantuvo por 48 h a 37 °C, 5 % de CO₂ y humedad a saturación. Posteriormente se realizaron lavados ligeros con PBS para eliminar

células no adheridas. Las células en cultivo son lisadas con NaOH (0.2 N). La solución alcalina es evaluada en líquido de centelleo en un contador de centelleo.

Determinación de moléculas de adhesión celular. Monocapas de células endoteliales cultivadas en placas de cultivo de 48 pozos, 2.5×10^5 células/pozo, fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α , 420 μ g/ml de medio condicionado células HeLa equivalente a 64 pg de TNF- α , antiTNF- α 3.2 μ g/ml por 1 h antes de agregar el medio condicionado de células Hela 420 μ g/ml, el control no fue estimulado para su activación pero se le realizó un cambio de medio fresco. Se incubó por 24 h a 37 °C, 5 % de CO₂ y humedad a saturación. Las células fueron cosechadas y fijadas con paraformaldehído al 4 % por 20 min, se lavó con PBS 3 veces y se les agregó 20 μ l del anticuerpo primario antiSelectina E, antiSelectina P, antiICAM-I o antiVCAM-I (Sta Cruz, US) a una dilución 1:100, incubando por 1 h a 37 °C. Se lavaron una vez con PBS y se agregó el anticuerpo secundario antiIgG de ratón (Roche, Alemania) en una dilución 1:100 por 1 h a 37 °C. Las muestras fueron lavadas con PBS. El botón se resuspendió en 0.5 ml de PBS y se evaluaron usando un citómetro de flujo FacsCalibur (Becton Dickinson).

Análisis estadístico: Los datos son presentados como la media con desviación estándar de al menos tres repeticiones por condición. Se realizó una comparación usando un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey con una significancia de $p < 0.05$. En las evaluaciones realizadas por citometría de flujo se presenta un experimento representativo.

11. RESULTADOS

Para determinar si la actividad inductora de adhesión presente en el medio condicionado de células HeLa es ocasionada por la presencia de TNF- α , se generaron 10 litros de medio condicionado, los cuales fueron concentrados por liofilización y dializados hasta obtener un volumen total de 10 ml con una concentración de proteína de 21 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Este medio condicionado concentrado (MC) se utilizó para la determinar la concentración de TNF- α .

Cuantificación de TNF- α .

El TNF- α presente en el medio condicionado de células HeLa fue cuantificado utilizando la técnica de ELISA, obteniendo una concentración de 64 μg de TNF- α en 420 μg de proteína total (0.1524 $\text{pg}/\mu\text{g}$) (Figura 1).

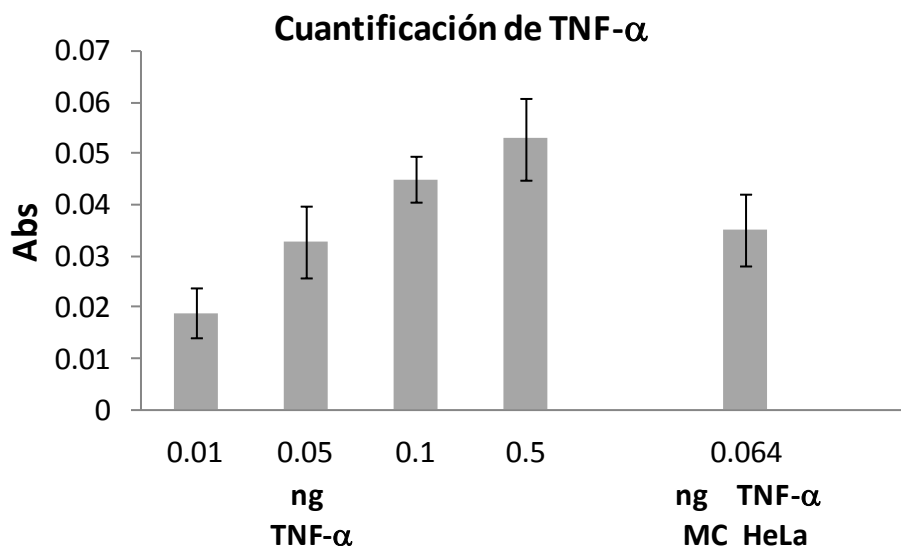


Figura 1.- Determinación de la cantidad de TNF- α presente en el medio condicionado de células HeLa. Se utilizaron concentraciones de 0.01 a 0.5 ng TNF- α en la curva patrón, así como 420 μg de proteína equivalentes a 20 μl de medio condicionado de células HeLa concentrado (MC). La evaluación se realizó por el ensayo de ELISA, cada concentración se uso por triplicado.

Actividad biológica del TNF- α presente en el medio condicionado.

Con el propósito de establecer si el TNF- α presente en el medio condicionado de células HeLa es biológicamente activo, células L929 fueron tratadas con diferentes concentraciones de TNF- α recombinante de 10 a 15 000 ng/ml, y con 210, 315, 420, 840 y

1050 μg de proteína total proveniente del medio condicionado de células HeLa, correspondiente a 32, 48, 64, 128 y 160 pg/ml de $\text{TNF-}\alpha$, la actividad citotóxica fue determinada en presencia de actinomicina D (AD) la cual potencia el efecto del $\text{TNF-}\alpha$ sobre las células L929 (Figura 2).

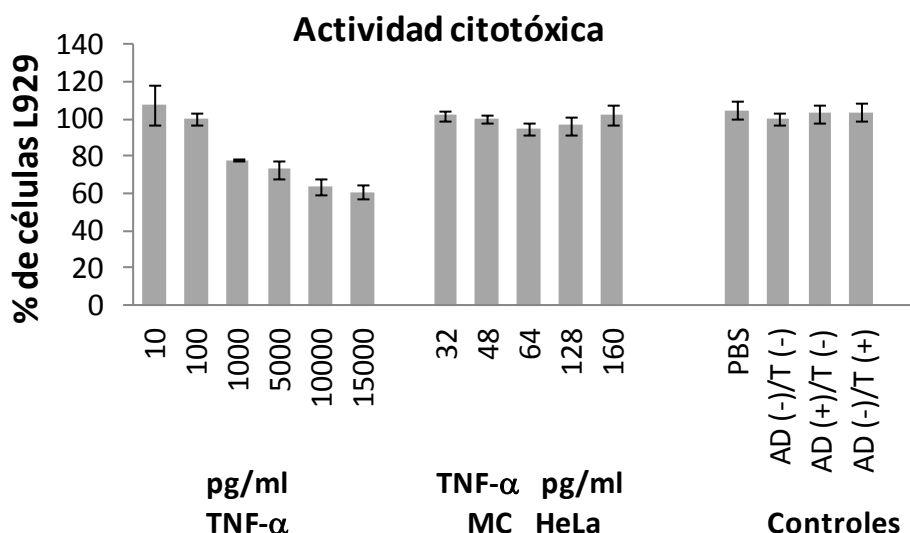


Figura 2.- Actividad citotóxica del medio condicionado de células HeLa sobre la línea celular L929. Células L929 fueron cultivadas en presencia de $\text{TNF-}\alpha$ de 10 a 15 000 ng/ml y proteína del medio condicionado de HeLa de 210 a 1050 $\mu\text{g/ml}$ equivalentes de 32 a 160 pg/ml de $\text{TNF-}\alpha$. Tanto al $\text{TNF-}\alpha$ como al MC se le agregó 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de actinomicina D. Los controles: PBS diluyente de la proteína agregada a los cultivos, AD(+)/T(-) cultivo en presencia de actinomicina D sin $\text{TNF-}\alpha$, AD (-)/T(+), cultivo en ausencia de actinomicina D y 5 000 pg/ml de $\text{TNF-}\alpha$, AD(-)/T(-) cultivo en ausencia de actinomicina D y sin $\text{TNF-}\alpha$ que representa el 100 % de sobrevivencia. Los ensayos fueron realizados por triplicado. ANDEVA $p < 0.05$.

Los resultados observados en la figura 2 establecen que el $\text{TNF-}\alpha$ presente en el medio condicionado de células HeLa a concentraciones de 32 a 160 pg/ml (210 a 1050 $\mu\text{g/ml}$ de proteína total del medio condicionado) no presenta actividad citotóxica en las células L929.

Inducción de Adhesión Celular.

Con la intención de determinar si el medio condicionado de células HeLa induce adhesión celular, cocultivos de células U937 y células endoteliales de cordón umbilical humano fueron tratados con 1050 $\mu\text{g/ml}$ de proteína total (160 pg de $\text{TNF-}\alpha$) concentración mínima en la cual se puede apreciar la adhesión de las células U937 a las monocapas de endotelio (Figura 3).

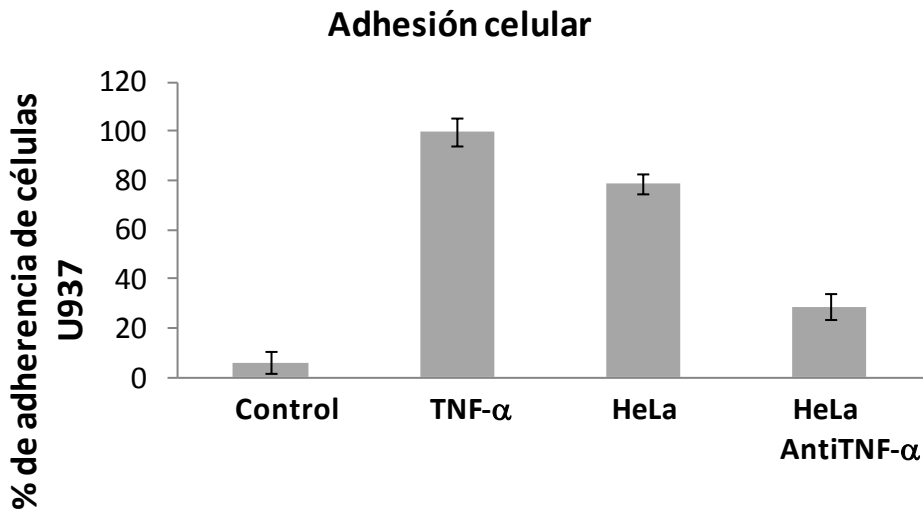


Figura 3.- Actividad inductora de adhesión celular del medio condicionado de células HeLa. Monocapas de endotelio sin activar y activadas con TNF- α (10 ng/ml), con medio condicionado de células HeLa (160 pg/ml de TNF- α), así como con medio condicionado tratado con el anticuerpo antiTNF- α (3.2 μ g/ml). Una vez activadas las monocapas de endotelio se agregó células U937 marcadas con [3H]-timidina, se mantuvieron por 48 h. Las células U937 adheridas fueron evaluadas en un contador de centelleos. Porcentajes de acuerdo al efecto del TNF- α .

Los resultados mostrados en la figura 3 indican que el medio condicionado de células HeLa presenta actividad inductora de adhesión celular, la cual es bloqueada al tratar al medio condicionado con anticuerpo neutralizante contra TNF- α , provocando la disminución en un 50 % de la actividad del medio condicionado de HeLa, sugiriendo la participación del TNF- α en la inducción de adhesión celular presente en este medio condicionado.

Moléculas de adhesión celular.

Una vez determinada la actividad inductora de adherencia celular, es necesario determinar el perfil de expresión de moléculas de adhesión en monocapas de endotelio, provocado por el tratamiento del medio condicionado de células HeLa. Al respecto, y considerando el papel que desempeñan diferentes moléculas de adhesión en el proceso de adhesión celular, la selectina E, selectina P, ICAM-I y VCAM-I fueron evaluadas.

Selectina E

La selectina E es una molécula de adhesión que participa en el primer evento de contacto entre células endoteliales y células que viajan por el torrente sanguíneo. Su función es disminuir la velocidad de flujo en un proceso denominado “rolling”. Con el propósito de establecer si el medio condicionado de células HeLa es capaz de inducir la expresión de selectina E en células endoteliales, cultivos de células endoteliales en monocapa fueron estimulados con 420 $\mu\text{g/ml}$ de proteína total (64 pg de $\text{TNF-}\alpha$) proveniente del medio condicionado de células HeLa y la expresión de selectina E fue determinada por citometría de flujo (Figura 4).

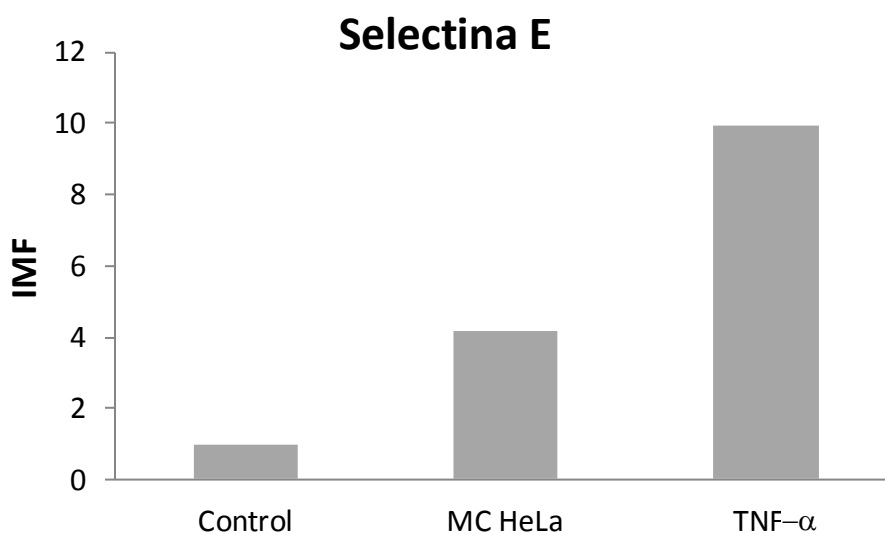


Figura 4.- Efecto del medio condicionado de células HeLa en la expresión de selectina E. Cultivos en monocapa de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano fueron tratados con $\text{TNF-}\alpha$ 10 ng/ml y medio condicionado de HeLa 64 pg/ml de $\text{TNF-}\alpha$. El control solo contiene medio de cultivo sin tratamiento, y el positivo 10 ng/ml de $\text{TNF-}\alpha$. Se evaluó por citometría de flujo, los valores representan el incremento relativo de acuerdo al control en intensidad media de fluorescencia (IMF). Ensayo representativo de al menos tres repeticiones.

Como se observa en la Figura 4, las monocapas de células endoteliales de cordón umbilical humano estimuladas con el medio condicionado de células HeLa, 420 $\mu\text{g/ml}$ (64 pg de $\text{TNF-}\alpha$), indujo un aumento en la expresión de selectina E de 4.2 veces con respecto al control, mientras el $\text{TNF-}\alpha$ recombinante fue de 9.9 veces, sugiriendo que el medio condicionado de células HeLa induce la expresión de selectina E.

– α

Sin embargo, cuando el medio condicionado de células HeLa fue tratado con un anticuerpo neutralizante contra el $\text{TNF-}\alpha$, la expresión de la selectina E se redujo en un 53

% (Figura 5), sugiriendo que el TNF- α presente en el medio condicionado de las células HeLa participa en la expresión de la selectina E.

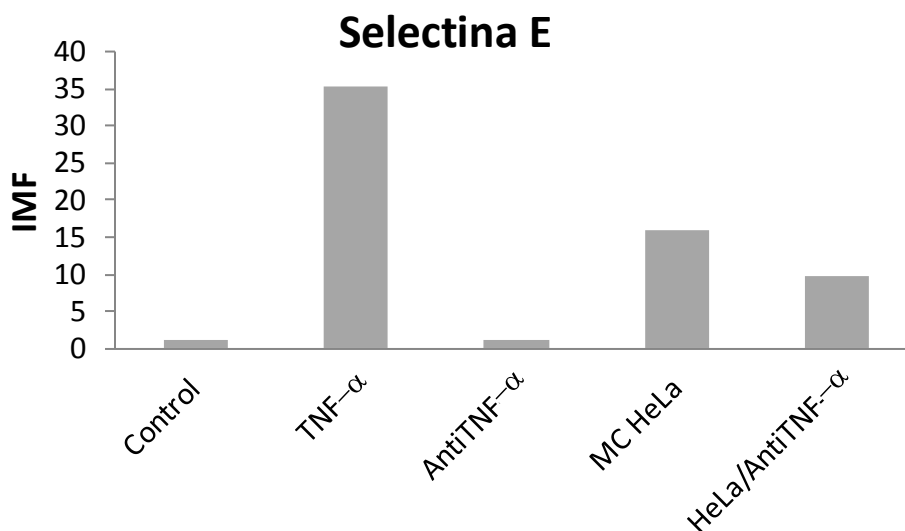


Figura 5.- Efecto del medio condicionado de células HeLa en la expresión de selectina E. Cultivos en monocapa de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano fueron tratados con antiTNF- α (3.2 μ g/ml) por 1 h antes de agregar TNF- α 10 ng/ml y medio condicionado de HeLa 64 pg/ml de TNF- α . El control solo contiene medio de cultivo sin tratamiento, y el positivo 10 ng/ml de TNF- α . Se evaluó por citometría de flujo, los valores representan el incremento relativo de acuerdo al control en intensidad media de fluorescencia (IMF). Ensayo representativo de al menos tres repeticiones.

Selectina P

La selectina P, al igual que la selectina E, participa en el proceso de adhesión de células que viajan por el torrente sanguíneo, por lo que es necesario establecer si, el medio condicionado de células HeLa es capaz de inducir la expresión de selectina P en células endoteliales. Al respecto, cultivos de células endoteliales en monocapa, fueron estimulados con 420 μ g/ml de proteína total proveniente del MC de células HeLa y la expresión de selectina P fue determinada por citometría de flujo (Figura 6).

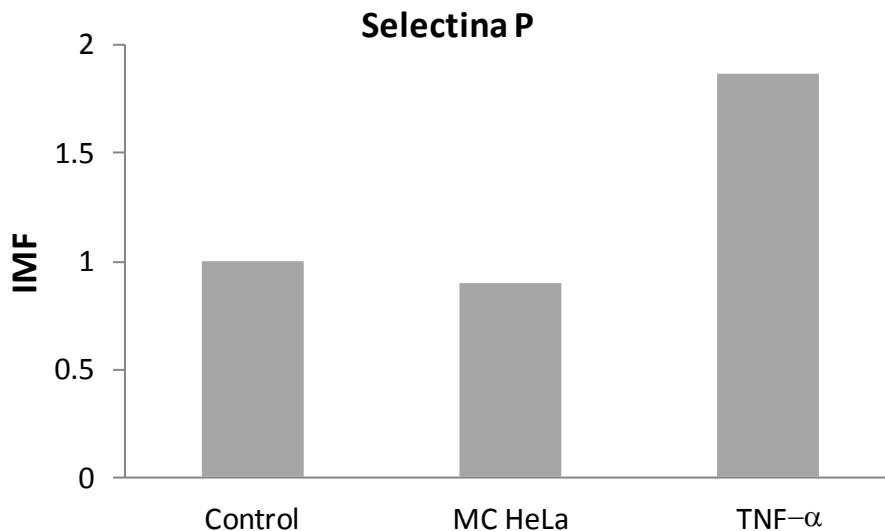


Figura 6.- Efecto del medio condicionado de células HeLa en la expresión de selectina P. Cultivos en monocapa de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano fueron tratados con TNF- α 10 ng/ml y MC de HeLa 64 pg/ml de TNF- α . El control solo contiene medio de cultivo sin tratamiento, y el positivo 10 ng/ml de TNF- α . Se evaluó por citometría de flujo, los valores representan el incremento relativo de acuerdo al control en intensidad media de fluorescencia (IMF). Ensayo representativo de al menos tres repeticiones.

Los resultados obtenidos (Figura 6) muestran que el medio condicionado de células HeLa, 420 μ g/ml (64 pg de TNF- α), no induce un aumento en la expresión de selectina P.

ICAM-I

La molécula de adhesión intercelular I (ICAM-I) es una molécula de adhesión que participa en la interacción de las células que viajan por el torrente sanguíneo y las células endoteliales, su expresión está condicionada por el estímulo de citocinas inflamatorias y media eventos de adhesión firme. Con el fin de establecer si el MC de células HeLa induce un aumento en la expresión de la ICAM-I, cultivos de células endoteliales de cordón umbilical fueron tratados con 420 μ g/ml (64 pg de TNF- α) de proteína total proveniente de medio condicionado de cultivos de células HeLa y la expresión de ICAM-I fue determinada por citometría de flujo (Figura 7).

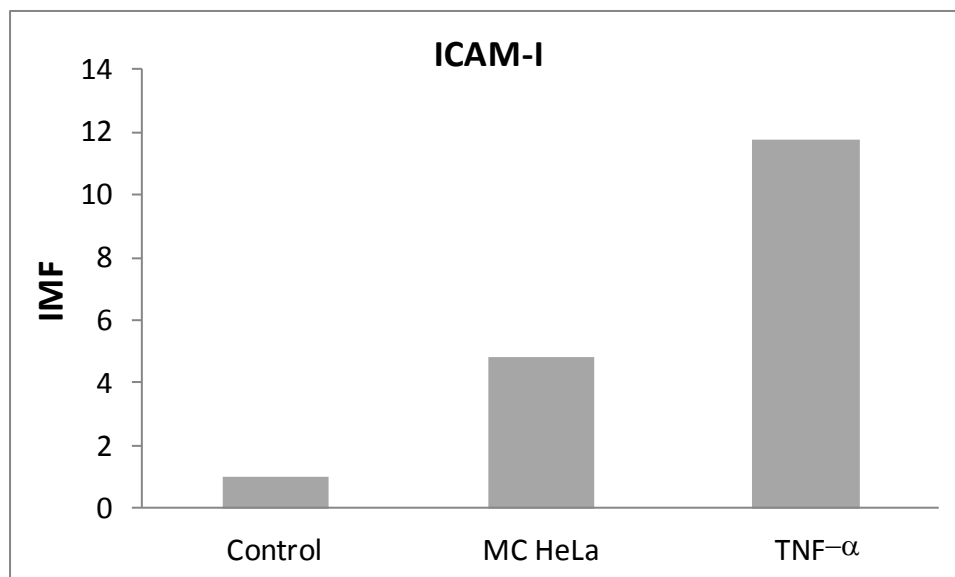


Figura 7. Efecto del medio condicionado de células HeLa en la expresión de la ICAM-I. Cultivos en monocapa de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano fueron tratados con TNF- α 10 ng/ml y medio condicionado de HeLa 64 pg/ml de TNF- α . El control solo contiene medio de cultivo sin tratamiento, y el positivo 10 ng/ml de TNF- α . Se evaluó por citometría de flujo, los valores representan el incremento relativo de acuerdo al control en intensidad media de fluorescencia (IMF). Ensayo representativo de al menos tres repeticiones.

Los datos mostrados en la figura 7 indican que el medio condicionado de células HeLa inducen un incremento en la expresión de ICAM-I, 4.8 veces con respecto al control, sugiriendo que esta molécula participa en la actividad inductora de adherencia celular presente en el medio de cultivo. Además, cuando el medio condicionado fue tratado con antiTNF- α (Figura 8), la expresión de ICAM-I inducida por el medio condicionado fue disminuida hasta un 60 %, indicando que el TNF- α presente en el medio condicionado participa en la sobreexpresión de esta molécula.

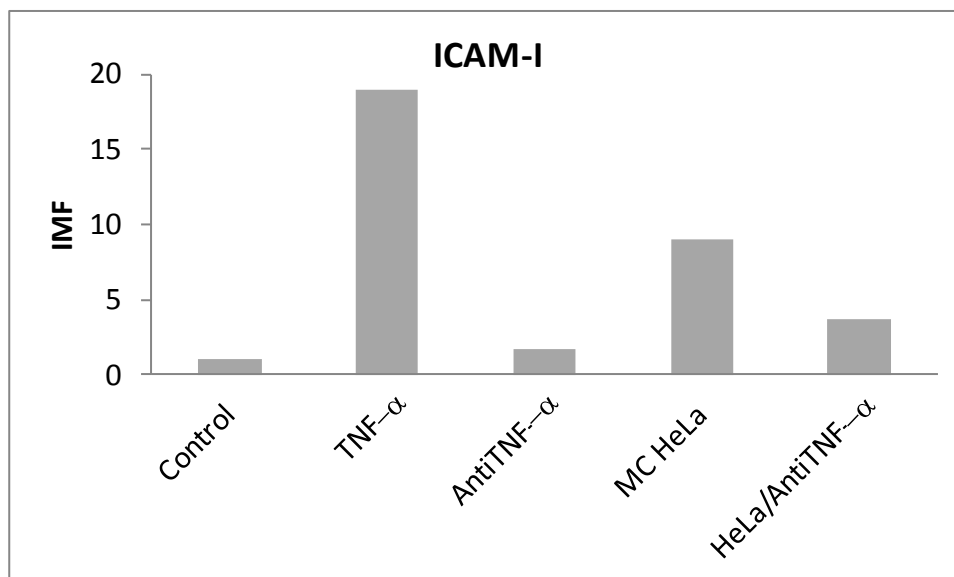


Figura 8.- Efecto del medio condicionado de células HeLa en la expresión de ICAM-I. Cultivos en monocapa de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano fueron tratados con antiTNF- α (3.2 μ g/ml) por 1 h antes de agregar TNF- α 10 ng/ml y medio condicionado de HeLa 64 pg/ml de TNF- α . El control solo contiene medio de cultivo sin tratamiento, y el positivo 10 ng/ml de TNF- α . Se evaluó por citometría de flujo, los valores representan el incremento relativo de acuerdo al control en intensidad media de fluorescencia (IMF). Ensayo representativo de al menos tres repeticiones.

VCAM-I

Al igual que ICAM-I, la molécula de adhesión de células vasculares-I (VCAM-I) participa en eventos de adhesión firme y con la intención de determinar si esta molécula participa en la actividad inductora de adherencia celular presente en el medio condicionado de células HeLa, cultivos de células endoteliales de cordón umbilical fueron tratados con 420 μ g/ml (64 pg de TNF α) de proteína total proveniente de medio condicionado de cultivos de células HeLa y la expresión de VCAM-I fue determinada por citometría de flujo (Figura 9).

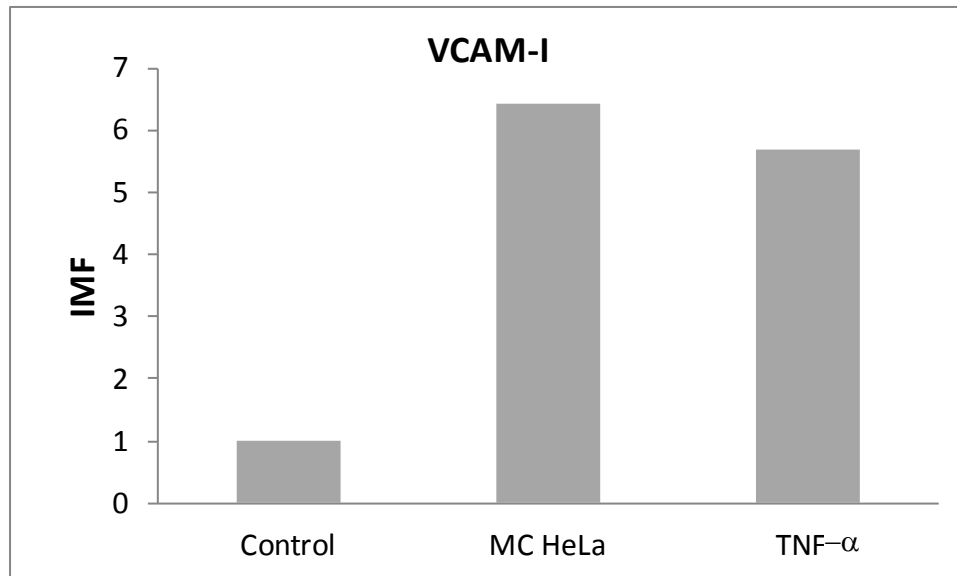


Figura 9. Efecto del medio condicionado de células HeLa en la expresión de la VCAM-I. Cultivos en monocapa de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano fueron tratados con TNF- α 10 ng/ml y medio condicionado de HeLa 64 pg/ml de TNF- α . El control solo contiene medio de cultivo sin tratamiento, y el positivo 10 ng/ml de TNF- α . Se evaluó por citometría de flujo, los valores representan el incremento relativo de acuerdo al control en intensidad media de fluorescencia (IMF). Ensayo representativo de al menos tres repeticiones.

Los resultados mostrados en la figura 10 indican que el medio condicionado de células HeLa inducen la expresión de VCAM-I, 6 veces más con respecto al control, implicando la participación de esta molécula en la actividad inductora de adhesión presente en el medio condicionado de cultivos de células HeLa. Además, el decremento observado de VCAM-I cuando el medio condicionado fue tratado con antiTNF- α (Figura 10), sugiere que el TNF- α participa en la inducción de la sobre expresión de esta molécula.

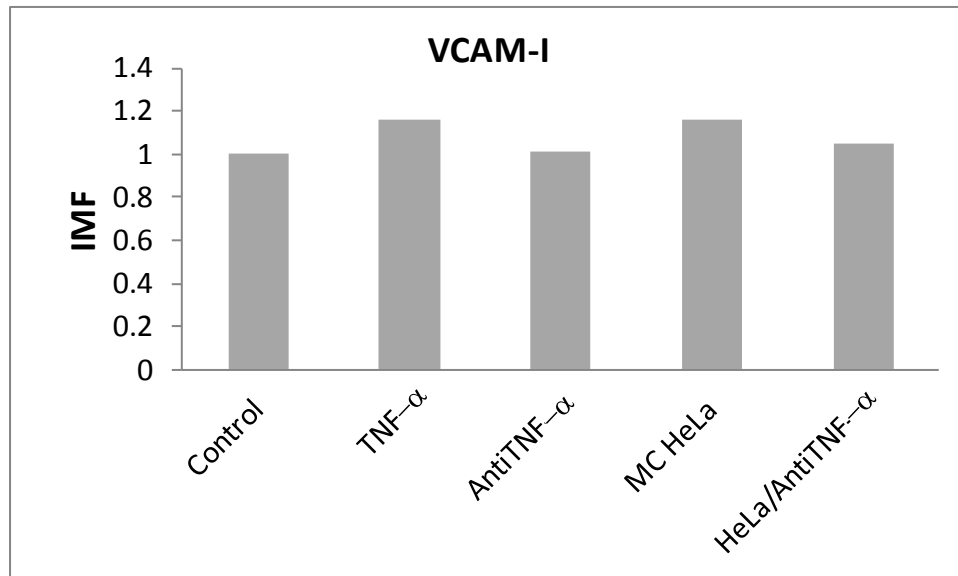


Figura 10. Efecto del medio condicionado de células HeLa en la expresión de ICAM-I. Cultivos en monocapa de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano fueron tratados con antiTNF- α (3.2 μ g/ml) por 1 h antes de agregar TNF- α 10 ng/ml y medio condicionado de HeLa 64 pg/ml de TNF- α . El control solo contiene medio de cultivo sin tratamiento, y el positivo 10 ng/ml de TNF- α . Se evaluó por citometría de flujo, los valores representan el incremento relativo de acuerdo al control en intensidad media de fluorescencia (IMF). Ensayo representativo de al menos tres repeticiones.

12. DISCUSIÓN

Durante la progresión del cáncer, la metástasis es la última fase que culmina con la invasión de órganos distantes, para alcanzar esta característica, las células neoplásicas deben adquirir cualidades que les permitan desprenderse de la masa tumoral primaria e invadir el tejido adyacente, acceder a la vasculatura para su dispersión vía hematogena o linfática y salir de ésta para colonizar nuevos sitios en órganos lejanos al sitio de crecimiento primario (Eccles and Welch 2007). Es la metástasis el estado en el cual se tiene los pronósticos de sobrevivencia más bajos clínicamente, por lo que es obligado entender los procesos celulares que se presentan para poder diseñar estrategias adecuadas para su mitigación.

Una vez que una célula neoplásica se dispersa por la vasculatura debe salir de ésta, y es en este momento, en el que las interacciones celulares entre el endotelio vascular y las células tumorales son explicadas en el contexto de la adhesión celular, imitando las interacciones que se dan durante el reclutamiento de leucocitos en el proceso inflamatorio (Cavallaro and Christofori, 2001); para cumplir con esta interacción es importante la activación del endotelio, lo cual se da por la acción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α que de forma clásica, es secretado por células del sistema inmune como macrófagos y células dendríticas, pero que recientemente se ha propuesto, también células tumorales de origen epitelial pueden secretarlo (Candido and Hagemann, 2013). En este punto se ha probado que cultivos primarios de tumores de cérvix pueden producir TNF- α , lo que las conduciría a un efecto autócrino de proliferación y sobrevivencia (Gaiotti *et al*, 2000), sin embargo, son pocos los estudios que evalúan el efecto de tal TNF- α sobre la propiedad de inducir activación del endotelio (Flores-Guzman, 2003), aunque se tiene el conocimiento que la oncoproteína E7 del VPH-16 es capaz de activar endotelio de manera diferencial (D'Anna *et al*, 2001); pero por otro lado, existe el antecedente que el medio condicionado de cultivos de la línea celular HeLa es capaz de inducir adherencia de células monocíticas U937 sobre monocapas de endotelio de vena de cordón umbilical humano aunque no es claro que moléculas de adhesión participan en esta activación endotelial.

Por lo anterior en el presente trabajo se avaluó el perfil de moléculas de adhesión que participan en la inducción de adherencia de las células U937 sobre los endotelios de vena de cordón umbilical humano estimulados con el sobrenadante concentrado de cultivos de la línea celular HeLa.

El medio de cultivo condicionado libre de suero de células HeLa, concentrado por liofilización (1000 veces), obtenido para este estudio presentó una concentración de 0.15 pg de TNF- α por μ g de proteína total. Las pruebas de actividad de TNF- α para este medio condicionado consistieron en prueba de citotoxicidad en la línea celular L929 la cual es

sensible al TNF- α en presencia de actinomicina D (Flick and Gifford, 1984), y la inducción de adhesión de células U937 a monocapas de endotelio (Poher *et al*, 1986).

La prueba de citotoxicidad del TNF- α sobre la línea celular L929 fue negativa, sin embargo la inducción de la adherencia fue positiva, tales pruebas indican que el TNF- α presente en el medio condicionado es biológicamente activo, aunque la falta de actividad citotóxica puede deberse a la baja concentración de TNF- α contenido en el MC de células HeLa, dado que se necesita una concentración de 10 ng/ml de TNF- α para inducir un 50 % de citotoxicidad en células L929 a las 16 h de tratamiento, y la máxima concentración de éste en el MC de células HeLa usado sólo alcanzó 160 pg/ml, concentración en la cual si se detecta activación de endotelio y adherencia de células U937 a las 48 h.

Una vez determinado que el medio condicionado induce adherencia celular, se determinó el perfil de proteínas de adhesión que participan. Los antecedentes indican que cultivos primarios de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano estimulados con TNF- α recombinante expresan selectina E (Chinthamani *et al*, 2012) y que ésta participa en procesos de adherencia de células monocíticas y tumorales. Al evaluar si el medio condicionado induce la expresión de selectina E se encontró un efecto positivo y aunque es menor la cantidad de selectina E expresada con respecto al estímulo con TNF- α se expreso 3 veces más que en el control. Esta actividad fue revertida usando antiTNF- α en un 40 %.

La selectina P es otra molécula de adhesión cuya expresión es inducida por efecto del TNF- α recombinante sobre células endoteliales (Weiser *et al*, 2007) y que también está relacionada con los primeros eventos de adherencia de células monocíticas. Al evaluar si el medio condicionado de células HeLa induce la expresión de esta selectina se encontró que no induce su expresión. Lo anterior deja únicamente a la selectina E como mediadora del primer encuentro de adhesión de las células monocíticas. Estudios previos indican que una concentración de 5-10 ng/ml de TNF- α se induce la expresión de esta selectina, lo que indica que la concentración presente en el MC de células HeLa puede no ser suficiente para inducir su expresión.

Los receptores de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas son moléculas de adhesión que participan en el establecimiento de adhesión firme y que participan en la interacción célula-célula solo después de las selectinas. Se sabe que endotelios estimulados con TNF- α recombinante expresan las moléculas de adhesión ICAM-I y VCAM-I (Iwasawa *et al*, 2008). Al estimular cultivos de endotelio con el medio condicionado de células Hela se encontró un aumento de ICAM-I de 3 veces más que el control sin estímulo, pero que solo alcanzo un 41 % de actividad del TNF- α . La expresión de ICAM-I fue revertida al usar antiTNF- α bajando a un 33% de la actividad del medio condicionado solo.

De igual manera VCAM-I se expresó 5 veces más que en el control, al estimular con el medio condicionado de células HeLa, los valores de expresión de VCAM-I rebasaron los inducidos por el TNF- α recombinante en un 13 %. El medio condicionado de células HeLa superó en actividad al TNF- α en la expresión de ésta molécula de adhesión. El uso de antiTNF- α solo disminuyó un 10 % el estímulo del medio condicionado.

Los resultados demuestran que las células HeLa son capaces de producir y secretar TNF- α biológicamente activo. La inducción de adherencia de células monocíticas a través de las moléculas selectina E, ICAM-I y VCAM-I concuerda con los antecedentes de activación de endotelio de vena de cordón umbilical humano con TNF- α , sin embargo la ausencia de actividad citotóxica hace pensar en la posibilidad de un polimorfismo para el gen del TNF- α , ya que se han reportado varios relacionados a la incidencia del cáncer cérvico-uterino.

La presencia de TNF- α en los medios de cultivo de células HeLa concuerda con el reporte de Himeno *et al* (1990) donde se observa un efecto autócrino que induce la sobrevivencia y proliferación en diversas líneas celulares tumorales. Las bajas concentraciones de TNF- α en el medio de cultivo hacen notar una ínfima producción por célula, hecho que no pasa desapercibido si se busca una relación entre las células tumorales que viajan por el torrente sanguíneo y las células del endotelio, ya que para la activación de estas últimas sería necesario un estrecho acercamiento de la célula tumoral, lo que resultaría más viable en vasos sanguíneos pequeños.

El TNF- α presente en el medio condicionado de células HeLa participa en la activación del endotelio, pero el hecho de no revertir tal estímulo con anticuerpos neutralizante de TNF- α , indicaría que esta citocina no es la única que está actuando en tal efecto. Dado que se conoce que existen otras citocinas que tienen el mismo efecto del TNF- α sobre el endotelio, se debe explorar el papel de moléculas como interleucina-1, para determinar el papel que juega en la activación de células endoteliales por efecto del medio condicionado de las células HeLa.

Dado que las células HeLa son capaces de expresar TNF- α es de interés determinar si otras líneas celulares presentan esta propiedad.

13. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que el medio condicionado de células HeLa contiene TNF- α e induce una activación de las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano. La respuesta de estas células endoteliales a la presencia de medio condicionado de células HeLa, es un aumento en la actividad de adhesión de células U937, y en tal actividad se presenta un aumento en la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales. La actividad de adherencia se ve influida por las moléculas de adhesión selectina E y las moléculas ICAM-I y VCAM-I, no participando la selectina P en esta actividad a la concentración de 64 pg/ml de TNF- α en el MC de células HeLa.

El TNF- α secretado por las células HeLa es biológicamente activo e induce activación de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.

15. REFERENCIAS

1. Abbas A K, Lichtman A H. 2003. *Inmunología celular y molecular*. 5ª ed. Elsevier. España. pp. 563.
2. Alberts B, Bray D, Lewys J, Raff M, Roberts K, Watson J D. 2002. *Bilología molecular de la célula*. 3a ed. Ediciones Omega. Barcelona. pp 1387.
3. Arakawa T, Yphantis D A. 1987. Molecular weight of recombinant tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem*, 262: 74-84.
4. Bazzoni G, Dejana E. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*, 84: 869-901.
5. Ben-Baruk A. 2008. Organ selectivity in metastasis: regulation by quimiokines and their receptors. *Clin Exp metastasis*, 25(4): 345-356.
6. Brodt P, Fallavollita L, Bresalier R S, Meterissian S, Norton C R, Wolitzky B A. 1997. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. *Int J Cancer*, 16;71(4):612-9.
7. Burdick M M, McCarty O J T, Jadhav S, Konstantopoulos K. 2001. Cell-cell interactions in inflammation and cancer metastasis. *IEEE Engineering In Medicine And Biology*, may/june: 86-91.
8. Candido J, Hagemann T. 2013. Cancer-related inflammation. *J Clin Immunol*, 33(1S): 79-84.
9. Carswell E A, Old L J, Kassel R L., Green S, Fiore N, Williamson B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Nat Acad Sci*, 72(9): 3666-3670.
10. Cavallaro U, Christofori G. 2001. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1552: 39-45.
11. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini P L. 2011. The immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 60:319–326.
12. Chandrasekharan U M, Siemionow M, Unsal M, Yang L, Poptic E, Bohn J, Ozer K, Zhou Z, Howe P H, Penn M, Di Corleto P E. 2007. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) receptor-II is required for TNF- α -induced leukocyte-endothelial interaction in vivo. *Blood*, 109(5):1938-1944.
13. Chinthamani S, Odusanwo O, Mondal N, Nelson J, Neelamegham S, Baker O J. 2012. Lipoxin A4 inhibits immune cell binding to salivary epithelium and vascular endothelium. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302(7): C968–C978.
14. Cook-Mills J M, Deem T L. 2005. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol*, 77(4):487-95.
15. D'Anna R, Le Buanec H, Bizzini B, Burny A, Giannouli C, Zagury JF, Gallo RC, Zagury D, D'Alessio P. 2001. Human papillomavirus-16-E7 oncoprotein enhances the expression of adhesion molecules in cervical endothelial cells but not in human umbilical vein endothelial cells. *J Hum Virol*. 4:85-95.

16. De Vita V, Hellman S. 1993. Carcinoma of the cervix. In: cancer: principles practice of oncology. 4 ed. Philadelphia: Lippincott:1168-1194.
17. Desai S, Kumar A, Laskar S, Pandey B N. 2013. Cytokine profile of conditioned medium from human tumor cell lines after acute and fractionated doses of gamma radiation and its effect on survival of bystander tumor cells. *Cytokine*, 61(1): 54-62.
18. Detmar M, Imcke E, Ruszaczak Z, Orfanos C E. 1990. Effects of recombinant tumor necrosis factor-alpha on cultured microvascular endothelial cells derived from human dermis. *J Invest Dermatol*, 95:20474-20481.
19. Diaconu N C, Rummukainen J, Mättö M, Naukkarinen A, Harvima R J, Pelkonen J, Harvima I T. 2008. Cervical squamous carcinoma cells are resistant to the combined action of tumor necrosis factor-alpha and histamine whereas normal keratinocytes undergo cytolysis. *BMC Cancer*, 8:46-60.
20. Eccles S A, Welch D R. 2007. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet*, 369: 1742- 1747.
21. Fidler I J. 1999. Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 43S: 3-10.
22. Flick DA, Gifford GE. 1984. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods*, 68(1-2): 167-175.
23. Flores Guzmán, F. 2003. Efecto del TGFβ1 y el TNF-α producidos por líneas de cáncer cervical sobre la proliferación de linfocitos y la adherencia celular. Tesis Maestría. IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
24. Gaiotti D, Chung , Iglesias M, Nees M, Baker P D, Evans Ch H, Woodworth C D. 2000. Tumor necrosis factor-a promotes human papillomavirus (hvp) e6/e7 RNA expression and cyclin-dependent kinase activity in hvp-immortalized keratinocytes by a ras-dependent pathway. *Molecular Carcinogenesis* 27:97-109.
25. Garrett I R, Durie B G, Nedwin G E, Gillispie A, Bringman T, Sabatini M, Bertolini D R, Mundi G R. 1987. Production of linphotoxin, a bone resorbing cytokine by cultures myeloma cells. *New England Journal of Medicine*,317:526-532.
26. Goeddel D V, Aggarwal B B, gray P W, Leung D W, Nedwin G W, Palladino M A, Patton J S, Pennica, D, Shepard H M Sugarman D J, Wong G H. 1986. Tumor necrosis factor: gene structure and biological activities. *Cole Spring Harbor Symp Quenat Biol*, 51,597-609.
27. Guevara-Pardo G. 2000. Cáncer y evolución. *Revista Colombiana de Cancerología*, 5(2): 14-21.
28. Guzmán-Rojas L, Alcocer-González J M, Madrid-Marina V. 1998. Perspectives for the development of vaccines and immunotherapy against cervico-uterine cancer. *Salud Publica Mex*, 40(1):38-46.
29. Hanahan D, Weinberg R A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, Vol. 100, 57-70.
30. Hazelbag S, Fleuren G J, Baelde J J, Schuurin E, Kenter G G, Gorter A. 2001. Cytokine profile of cervical cancer cells. *Gynecol Oncol*, 83(2):235-43.

31. Hermunen K, Haglund C, Osterlund P. 2013. CEA fluctuation during a single fluorouracil-based chemotherapy cycle for metastatic colorectal cancer. *Anticancer Res*, 33(1):253-60.
32. Himeno T, Watanabe N, Yamauchi N, Maeda M, Tsuji Y, Okamoto T, Neda H, Ninsu Y. 1990. Expression of endogenous tumor necrosis factor as a protective protein against the cytotoxicity of exogenous tumor necrosis factor. *Cancer Research*, 50(16):4941-4945.
33. Hunter K W. 2004. Host genetics and tumor metastasis. *British Journal of cancer*, 90(4): 752-755.
34. INEGI (2011). Consulta interactiva de datos. Estadísticas de mortalidad. Consultada el 9 de enero del 2012. Disponible en: www.inegi.gob.mx
35. Iwasawa k, Kameyama T, Ishikawa H, Sawa Y. 2008. Induction of ICAM-1 and VCAM-1 on the mouse lingual lymphatic endothelium with TNF- α . *Acta Histochem Cytochem*, 41(5):115-120.
36. Jaffe E A, Nachman R L, Becker C G, Miinick C R. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of Clinical Investigation*,52:2745-2756.
37. Jian-Guo G. 2003. Interaction of vascular endothelial cell with leukocytes, platelets and cancer cells in inflammation, thrombosis and cancer growth and metastasis. *Acta Pharmacol Sin*, 24(12):1297-1300.
38. Juliano R L. 2002. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42:283-323.
39. Keleg S, Büchler P, Ludwig R, Büchler M W, Fries H.2003. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer*, 22: 2-14.
40. Kriegler M, Pere C, DeFay K, Lu S D. 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for complex physiology of TNF. *Cell*, 53,45.
41. Lee J Y, Jung H J, Song I S, Williams M S, Choi C, Rhee S G, Kim J, Kang S W. 2009. Protective role of cytosolic 2-cys peroxiredoxin in the TNF- α -induced apoptotic death of human cancer cells. *Free Radic Biol Med*, ;47(8):1162-71.
42. Leong S P L, Cady B, Jablons D M, Garcia-Aguilar J, Reintgen D, Jakub J, Pendas S, Duhaime L, Cassell R, Gardner M, Guiliano R, Archie V, Calvin D, Mensha L, Shivers S, Cox C, Werner J A, Kitagawa Y, Kitajima M. 2006. Clinical patterns of metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 25:221-232.
43. Longworth M S, Laimins L A. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(2):362-72.
44. López-Saavedra A, Lizano-Soberón M. 2006. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*, 1: 31-55.

45. Malejczyk J, Malejczyk M, Kock A. 1992. Autocrine growth limitation of human papillomavirus type-16 harboring keratinocytes by constitutively released tumor necrosis factor- α . *J Immunol*, 149:2702–2708.
46. McEver R, Moore K L, Cummings R D. 1995. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem*, 270(19): 11025-11028.
47. Meagar A. 1999. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 10: 27-39.
48. Mendoza L, Carrascal T, de Luca M, Fuentes A M, Salado C, Blanco J, Vidal-Vanaclocha F. 2001. Hydrogen peroxide mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression from interleukin-18 –activated hepatic sinusoidal endothelium: implications for circulating cancer cell arrest in the murine liver. *Hepatology*, 34: 298-310.
49. Miles F L, Pruitt F L, Van Golen K L, Cooper C R. 2008. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 25(4):305-24.
50. Mocellin S, Rossi C R, Pilati P, Nitti D. 2005. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16: 35-53.
51. Motoyama S, Ladines-Llave C A, Villanueva S L, Maruo T. 2004. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J. Med. Sci*, 50(1) 9-19.
52. Muller W A. 2003. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *TRENDS in Immunology*, 24(6): 326-333.
53. Muñoz N, Bosch F X. 1997. Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Publica Mex*, 39(4):274-82.
54. Okahara H, Yagita H, Miyake K, Okumura K. 1994. Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res*, 54(12):3233-3236.
55. Orr F W, Wang H H, Lafrenie R M, Scherbarth S, Nance D M. 2000. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol*, 190:310-329.
56. Pober J S, Gimbrone M A Jr, Lapierre L A, Mendrick D L, Fiers W, Rothlein R, Springer T A. 1986. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol*, 137(6):1893-1896.
57. Pober J S. 2002. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res*, 4 Suppl 3:S109-116.
58. Powell C B, Scott J H, Collins J L. 1998. Comparison of TNF α and TNF β cytolytic mechanisms in human ovarian and cervical carcinoma cell lines. *Gynecologic Oncology* 71, 258-265.
59. Pucci B, Indelicato M, Paradisi V, Reali V, Pellegrini L, Aventaggiato M, Karpnich NO, Fini M, Russo M A, Farber J L, Tafani M. 2009. ERK-1 MAP kinase prevents

- TNF-induced apoptosis through bad phosphorylation and inhibition of Bax translocation in HeLa Cells. *J Cell Biochem*, 108(5):1166-74.
60. Raab M, Daxecker H, Markovic S, Karimi A, Griesmacher A, Mueller M M. 2002. Variation of adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells upon multiple cytokine application. *Clin Chim Acta*, 321(1-2):11-6.
 61. Risau W. 1995. Differentiation of endothelium. *FASEB J*, 9:926-933.
 62. Robache-Gallea S, Morand V, Bruneau J M, Schoot B, Tagat E, Realo E, Chouaib S, Roman-Roman S. 1995. *In vitro* processing of human tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*, 270(40):23688-23692.
 63. Sceneay J, Smyth M J, Möller A. 2013. The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev*, May 1 Epub ahead of print.
 64. Simiantonaki N, Jayasinghe C, Kirkpatrick C J. 2002. Effect of pro-inflammatory stimuli on tumor cell-mediated induction of endothelial cell adhesion molecules in Vitro. *Experimental and molecular pathology*, 73: 46-53.
 65. Simon S I, Green C E. 2005. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng*, 7:151-185.
 66. Slowik M R, de Luca L G, Fiers W, Pober J S. 1993. Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the activation at low tumor necrosis factor concentration. *Am J Pathol*, 143:1724-1730.
 67. Taichman D B, Cybulsky M I, Djaffar I, Longenecker B M, Teixid J, Rice G E, Aruffo A, Bevilacqua M P. 1991. Tumor cell surface $\alpha 4\beta 1$ integrin mediates adhesion to vascular endothelium: demonstration of an interaction with the N-terminal domains of INCAM-110/VCAM-1. *Cell Regulation*, 2: 347-355.
 68. Taja-Chayeb L, Salas-García M, Salcedo-Vargas M. 1996. Molecular bases of papillomavirus and polyomavirus carcinogenesis. *Salud Publica Mex*, 38(1):47-57.
 69. Takeichi M. 1993. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 5: 806-811.
 70. Tantivejkul K, Malikin L M, Pienta K J. 2004. Dynamic process of prostate cancer metastasis to bone. *Journal of Cell Biochemistry*, 91: 706-717.
 71. Vidal-Vanaclocha F, Fantuzzi G, Mendoza L, Fuentes A M, Anasagasti M J, Martí'n J, Carrascal T, Walsh P, Reznikov L L, Kim S-H, Novick D, Rubinstein M, Dinarello C A. 2000. IL-18 regulates IL-1b-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *PNAS*, 97: 734-739.
 72. Voura E B, Sandig M, Siu CH-H. 1998. Cell-Cell Interactions during transendothelial migration of tumor cells. *Microscopy Research and Technique* 43:265-275.
 73. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation*, 10: 45-65.
 74. Weinberg R A. 1996. How cancer arises. *Sci Am*, 275(3): 62-70.
 75. Weiser S, Miu J, Ball H J, Hunt N H. 2007. Interferon-gamma synergises with tumour necrosis factor and lymphotoxin-alpha to enhance the mRNA and protein expression of adhesion molecules in mouse brain endothelial cells. *Cytokine*, 37(1): 84-91.

76. Welch D R, Steeq P S, Rinker-Schaeffer C W. 2000. Molecular biology of breast cancer metastasis. Genetic regulation of human breast carcinoma metastasis. *Breast Cancer Res*, 2(6): 408-416.
77. Woodworth C D, McMullin E, Iglesias M, Plowman G D. 1995. Interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha stimulate autocrine amphiregulin expression and proliferation of human papillomavirus-immortalized and carcinoma-derived cervical epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(7):2840-4.
78. Wu Q D, Wang J H, Condrón C, Bouchier H, Redmond H P. 2001. Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280:C814-C822.
79. Yokota J. 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21(3): 497-503.
80. Zak I., Lewandowska E, Gnyś W. 2000. Selectin glycoprotein ligands. *Acta Biochimica Polonia*, 47 (2): 393-412.
81. Zavala-Zendejas V E, Rendón-Huerta E P. 2008. Alteración de la integridad de las uniones estrechas en el desarrollo del cáncer. El papel de las claudinas. *Bioquímica*, 33(1): 19-29.