



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INTERACCIONES DE CÉLULAS TUMORALES  
HUMANAS CON EL ENDOTELIO VASCULAR EN LA  
VENA UMBILICAL HUMANA PERFUNDIDA: UN  
MODELO *EX VIVO* DE METÁSTASIS HEMATÓGENA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:  
BIÓL. EDGAR JOSUÉ RUIZ MEDINA

TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA



Facultad de  
Química

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2004



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.

---

# INTERACCIONES DE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS CON EL ENDOTELIO VASCULAR EN LA VENA UMBILICAL HUMANA PERFUNDIDA: UN MODELO *EX VIVO* DE METÁSTASIS HEMATÓGENA

## RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, bajo la dirección del Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Enrique Ortega Soto	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Marco A. Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM

Este trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIIT, UNAM IN223498. Durante su realización Edgar Josué Ruiz Medina fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (170396), y de la Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.

Esta tesis fue defendida en el examen presentado el día \_\_\_\_\_

El Jurado de Exámen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Yvonne J. Rosenstein Azoulay	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dr. Enrique Ortega Soto	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
I. Cáncer	2
II. Angiogénesis	7
III. Metástasis	10
IV. Invasión	15
V. Intravasación, arresto y extravasación	23
ANTECEDENTES	26
VI. Interacciones entre células tumorales y el endotelio vascular durante la metástasis	26
VII. Modelos que han permitido estudiar las interacciones célula tumoral-endotelio	30
VIII. Perfusión	32
JUSTIFICACIÓN	35
HIPÓTESIS	36
OBJETIVO GENERAL	37
OBJETIVOS PARTICULARES	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
RESULTADOS	50
DISCUSIÓN	103
CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES	128
BIBLIOGRAFÍA	130

## RESUMEN

Las metástasis son responsables del ~90% de las muertes por tumores sólidos en humanos. Se ha postulado que uno de los eventos clave en la diseminación metastásica es el arresto de la célula tumoral y su adhesión a la microvasculatura de los órganos blanco. Para estudiar dichas interacciones, se han empleado modelos de cultivos primarios y líneas de células endoteliales humanas, de bovino y rata, y también se han estudiado las aortas de bovino, rata y porcino en preparaciones perfundidas. Sin embargo, aún son muy limitados los estudios en vasos sanguíneos humanos. En el presente trabajo investigamos las interacciones entre células tumorales humanas U937 y el endotelio vascular en un modelo de vena umbilical humana perfundida *ex vivo*. La viabilidad y la arquitectura endotelial se evaluaron por medio de tinciones vitales, ensayos enzimáticos, inmunofluorescencia, y microscopía electrónica de barrido. Los resultados mostraron células endoteliales positivas para el antígeno von-Willebrand en la zona marginal del vaso. Por microscopía electrónica de barrido observamos células endoteliales individuales con morfología fusiforme formando una monocapa endotelial continua. El endotelio de la vena perfundida retiene la capacidad de responder al estímulo con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) produciendo óxido nítrico. Después de estimular al endotelio con TNF- $\alpha$  por 2 h y de perfundir células tumorales U937 a través de la vena umbilical por una 1 h más, observamos un aumento en la adhesión de las células U937 al endotelio vascular activado. La adhesión fue significativamente mayor en venas umbilicales pre-tratadas con TNF- $\alpha$  comparadas con venas control. Los ensayos de inmunofluorescencia, sugieren que las integrinas de la familia beta-1 podrían estar implicadas en la adhesión de las células U937 durante el arresto a la vasculatura. En conjunto, estos resultados indican que la perfusión *ex vivo* de la vena umbilical humana, permite mantener la viabilidad y funcionalidad endotelial, y por tanto permite el estudio de las interacciones entre células tumorales y el endotelio vascular pudiendo servir como un modelo de la metástasis hematológica.

## INTRODUCCIÓN

### I. CÁNCER

El cáncer representa uno de los problemas de salud más importantes a nivel mundial, ya que es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en humanos a pesar de los avances en terapia médica y técnicas quirúrgicas.

En las últimas décadas, las tasas de incidencia y mortandad por cáncer han aumentado sustancialmente. Se estima que cada año cerca de 9 millones de personas desarrollan algún tipo de tumor maligno. De éstas poco más de la mitad viven en países en vías de desarrollo (World Health Organization, WHO, 2000). Desafortunadamente, al momento del diagnóstico la mayoría de los pacientes se encuentran en estados muy avanzados e incurables de la enfermedad. De continuar la misma tendencia en los próximos años, la mortalidad por cáncer aumentará en todas las regiones del mundo. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en 1998 murieron más de 7 millones de personas por algún tipo de neoplasia, que representan el 13% de todas las causas de mortandad a nivel mundial (World Health Organization, WHO, 2000).

En México, el cáncer es la segunda causa más común de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares. Tan solo en 1999 que murieron más de 53,000 personas por algún tipo de tumor maligno (SSA, 2000). De acuerdo con el Registro Histopatológico de Neoplasias de 1997, las cinco neoplasias más frecuentes fueron cáncer cervicouterino (22.9%), mama (10.3%), próstata (6%), ganglios linfáticos (4.7%), y estómago (4.2%).

Debido a la relevancia de este problema de salud, ha sido abordado por los científicos con estrategias que van desde la implementación de programas educativos para disminuir los riesgos de desarrollar algún proceso neoplásico, hasta el desarrollo de fármacos para el tratamiento de los pacientes y de vacunas profilácticas, como en el caso de tumores cervicales asociados a papilomavirus (Borysiewicz, *et al.*, 1996; Boursnell, *et al.*, 1996).

Pero, realmente ¿Qué sabemos del cáncer? ¿Cuál es su naturaleza? ¿Cómo se desarrolla? Estas y otras preguntas han inquietado y sido planteadas no sólo por médicos y científicos, sino también por filósofos durante cientos de años.

Aunque se podría creer que el cáncer es una enfermedad de nuestra época, esa visión es incorrecta, ya que ha acompañado a la humanidad a lo largo de su historia. Se tiene evidencia de tumores malignos provenientes de huesos humanos petrificados de hace aproximadamente 1.5 millones de años, y de carcinomas nasofaríngeos y sarcomas osteogénicos presentes en momias humanas del antiguo Egipto (Diamandopoulos, 1996). Interesantemente, hoy en día existe una alta incidencia de carcinoma nasofaríngeo entre la gente que vive en Egipto y en otras regiones del continente Africano. Probablemente, el manuscrito Hindú "El Ramayana" sea el primer registro que hace mención de tumores y de su tratamiento mediante la aplicación de ungüentos que contenían arsénico. Además, los médicos egipcios merecen el crédito por haber reconocido la existencia de diferentes tipos de tumor. Sin embargo, hasta entonces no se había dado alguna explicación acerca del origen del cáncer. Durante el período Helénico, la contribución más importante sobre la naturaleza del cáncer vino de observaciones realizadas por el gran filósofo griego y padre de la medicina Hipócrates (460-377 AC). Hipócrates retomó los cuatro elementos cardinales del Universo de Empédocles (aire, agua, tierra y fuego) y propuso que la salud y enfermedad resultaban de la mezcla normal o defectuosa de sus contrapartes biológicas (sangre-aire, flema-agua, bilis negra-tierra, bilis amarilla-fuego). Como resultado de esta observación, Hipócrates propuso la "teoría humoral" de la etiología del cáncer, y suscribió la noción de que el cáncer era ocasionado por un exceso de bilis negra. Además, clasificó a los tumores en dos grupos en base a su comportamiento en organismos vivientes; los tumores benignos o inocuos incluían úlceras y masas celulares, y los tumores malignos representaban neoplasias que eventualmente mataban al paciente. El punto de vista de Hipócrates con respecto al origen del cáncer, prevaleció como un dogma médico hasta finales del siglo XVII (Diamandopoulos, 1996).

Durante el Renacimiento, René Descartes (1596-1650) y otros científicos contemporáneos propusieron la "teoría linfoide" de la etiología del cáncer. Esta

nueva teoría sugería que cuando la linfa salía de los vasos linfáticos (descubiertos por Gasparo Aselli en 1622), se coagulaba localmente y formaba un tumor benigno, pero cuando la linfa "fermentaba" o "degeneraba" mientras estaba confinada, formaba un tumor maligno (Diamandopoulos, 1996).

A finales del siglo XVIII, las dos teorías acerca de la etiología del cáncer –humoral y linfoide- fueron gradualmente reemplazadas por el punto de vista de que el cáncer es ocasionado por cambios que ocurren en las células y los tejidos. La invención del microscopio compuesto y de lentes acromáticos permitió el estudio del cáncer a nivel microscópico. Los patólogos Johannes Müller (1801-1858), Rudolf Virchow (1821-1902) y Kart von Rokitanski (1804-1878), fueron los tres eminentes científicos del siglo XIX que establecieron las "bases celulares de la enfermedad". El primero de ellos –J. Müller- demostró que los tumores estaban formados por una acumulación de células, pero era de la idea de que las células tumorales no surgían de células normales. Más tarde, uno de sus pupilos, Rudolf Virchow, determinó que todas las células, incluyendo las células cancerosas, se derivan de otras células (Diamandopoulos, 1996).

## **IA. LA NATURALEZA DEL CÁNCER**

A pesar de que en las células humanas ocurren y se presentan diferentes cambios genéticos y epigenéticos, la incidencia de tumores en la población es más baja de lo que podría esperarse. Esto se debe a la eficiencia de los sistemas fisiológicos de reparación del genoma y a la eficacia con que son eliminadas las células con genomas alterados cuando los mecanismos de reparación fracasan.

Actualmente, se sabe que la proliferación celular es un proceso cuidadosamente regulado, que responde a necesidades específicas del organismo, que varían a lo largo del desarrollo, respondiendo a múltiples condiciones ambientales. Durante el desarrollo embrionario la proliferación celular excede a la muerte celular, permitiendo el crecimiento de todo el organismo. Sin embargo, en un adulto los procesos de proliferación y muerte celular están balanceados, de tal manera que el crecimiento celular se detiene y la división celular se reduce. El recambio celular en un organismo adulto, varía ampliamente dependiendo del tejido, por ejemplo, las células intestinales tienen una vida media de pocos días antes de que mueran y

sean reemplazadas; algunos glóbulos blancos son reemplazados muy rápidamente. En contraste, los eritrocitos humanos tienen una vida media de aproximadamente 100 días; las células hepáticas raramente mueren, y, en adultos, la tasa de pérdida de células cerebrales es, comparativamente, muy baja (Lodish *et al.*, 2004).

La proliferación celular se encuentra regulada por productos de proto-oncogenes (por ejemplo, Ras o Myc, entre otros), y está bajo control negativo de los genes supresores de tumores (por ejemplo, las proteínas Rb o p53) que previenen la proliferación celular descontrolada. No obstante, en ocasiones la regulación del ciclo celular se ve alterada, lo que produce una proliferación celular descontrolado y la eventual formación de tumores.

En la mayoría de los casos, los tumores humanos se desarrollan a través de una sucesión de cambios genéticos y epigenéticos –cambios en el patrón de expresión de genes, sin que se altere la secuencia del DNA- que confieren características distróficas y neoplásicas (tipo cáncer) a las células. De hecho, la formación de un tumor es un proceso con múltiples etapas secuenciales sometidas a un proceso de selección. De hecho, este proceso ha sido comparado a la evolución darwiniana dentro del microcosmo de los tejidos donde las unidades de selección son las células individuales (Nicolson, 1987). De esta forma, una célula que posea características ventajosas –adquiridas a través de mutaciones que favorecen su capacidad de sobrevivir y proliferar- será seleccionada hasta llegar a ser el progenitor de una población celular que eventualmente dominará la masa tumoral. De ahí que hoy sigue teniendo vigencia la teoría de un origen clonal de los tumores, donde una nueva variante que surge entre las muchas células de una generación, iniciará la próxima ronda de sucesión clonal. Se estima que se requieren entre seis y diez sucesiones clonales para generar células tumorales altamente malignas (Bernards and Weinberg, 2002).

Los cambios genéticos y epigenéticos, adquiridos por las células durante las fases iniciales de la progresión tumoral, que proporcionan un cierto tipo de ventaja proliferativa, capacitan a las células para transmitir sus alelos mutantes a su progenie dentro de la masa tumoral primaria. Entre estos fenotipos ventajosos está la adquisición de señales mitógenicas constitutivas, la habilidad de resistir a señales antiproliferativas, de evitar la muerte celular programada (apoptosis), de

poseer un potencial replicativo ilimitado, y de inducir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). Posteriormente, células individuales de esta gran población adquieren, con todo, más mutaciones que les permiten invadir tejidos adyacentes, diseminarse por todo el cuerpo a través del sistema linfático y/o vascular, y formar nuevas colonias en sitios anatómicos distantes al sitio de inicio de la masa tumoral primaria –proceso conocido como metástasis– (Hanahan and Weinberg, 2000). No obstante, en años recientes ha surgido un debate acerca de la etiología del potencial metastásico. Empleando microarreglos de DNA, diferentes grupos han propuesto que las metástasis pueden ser directamente dirigidas por mutaciones oncogénicas que existen en muchas células de un tumor primario (Van't Veer *et al.*, 2002; Ramaswamy *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003). Estos descubrimientos sugieren que algunas células tumorales primarias presentan el mismo patrón de expresión que las células metastásicas, en contraste al modelo clásico, el cual predice que solo una pequeña subpoblación de las células que constituyen al tumor primario adquirirá la capacidad metastásica a través de mutaciones somáticas aleatorias (Poste and Fidler, 1980). Entonces, ¿cómo reconciliar estas hipótesis aparentemente opuestas? Una posibilidad radica en la contribución que pueden tener los diferentes fondos genéticos de cada individuo y en particular de aquellos propensos al desarrollo de tumores (Hunter *et al.*, 2003). No obstante, a pesar de la falta de consenso sobre la naturaleza de las células metastásicas, es un hecho que el potencial metastásico es el principal obstáculo que afronta la oncología clínica, ya que es el evento que generalmente lleva al fracaso de los tratamientos y, por tanto, conduce a la muerte de los pacientes con cáncer.

En la actualidad, la investigación sobre los mecanismos básicos de la metástasis puede eventualmente conducir a un mejor entendimiento de las diferentes fases de este proceso, lo cual permitirá establecer y desarrollar mejores estrategias terapéuticas y fármacos, ya sea para limitar o prevenir la expansión de células tumorales hacia órganos distantes.

## II. ANGIOGÉNESIS

Normalmente, los tejidos reciben un suministro constante de oxígeno a través de moléculas de hemoglobina oxigenada, transportadas por el flujo continuo de sangre. Cuando los tejidos son sujetos a una deprivación de oxígeno –condición denominada hipoxia–, debido a una reducción del flujo sanguíneo o del contenido de oxígeno en la sangre, el resultado eventual es la muerte celular. La sensibilidad de los distintos tejidos de un organismo hacia la hipoxia depende de sus requerimientos metabólicos individuales. Bajo condiciones de hipoxia, los tejidos reaccionan de dos maneras: (i) cambiando a un estado protector mediante el uso de proteínas sensibles a hipoxia, denominadas factores inducibles por hipoxia, o HIFs (hypoxia-inducible factors); y (ii) produciendo proteínas angiogénicas que eventualmente atraerán nuevos vasos sanguíneos como una forma de restaurar el flujo sanguíneo local (Bottaro and Liotta, 2003).

Al igual que el crecimiento de un órgano o tejido normal, el desarrollo de un tumor, es dependiente del suministro de oxígeno y nutrientes, así como de la eliminación de moléculas tóxicas. El oxígeno puede difundir de capilares a sólo 150-200  $\mu\text{m}$ . Cuando la distancia entre las células tumorales y el capilar más próximo excede esta distancia, la masa tumoral muere (Gimbrone *et al.*, 1974). Por lo tanto, la expansión de la masa tumoral más allá de 1-2  $\text{mm}^3$  de diámetro es dependiente de la neovascularización y por tanto de la actividad angiogénica del tumor.

La formación de nueva vasculatura consiste de múltiples pasos interdependientes. Bajo condiciones normales de suministro de oxígeno, la proteína codificada por el gen supresor de tumores von Hippel-Lindau, pVHL, “marca” a las subunidades  $\alpha$  de HIF (HIF- $\alpha$ ) para su degradación a través del sistema de ubiquitina-proteasoma. El reconocimiento de estas subunidades por pVHL depende de una modificación de HIF- $\alpha$  que solo ocurre en presencia de oxígeno. Dicha modificación se presenta en su dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) por hidroxilación enzimática en residuos específicos de prolina (para HIF- $\alpha$  humano, en Pro 402 y Pro 564 en la porción N- y C-terminal, respectivamente) (Masson and Ratcliffe, 2003). En tumores, cuando el oxígeno escasea o pVHL esta mutada, la

hidroxilación no se presenta y HIF escapa de la degradación, ocasionando un incremento en sus niveles intracelulares, translocándose al núcleo y promoviendo la expresión de ciertos genes inducibles por hipoxia. De esta manera, los HIF promueven la expresión de proteínas pro-angiogénicas como VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular) –una proteína que estimula el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos- y de moléculas como la eritropoietina (EPO) –que estimula la producción de eritrocitos- (Fig. 1 y 4) (Bernards, 2003).

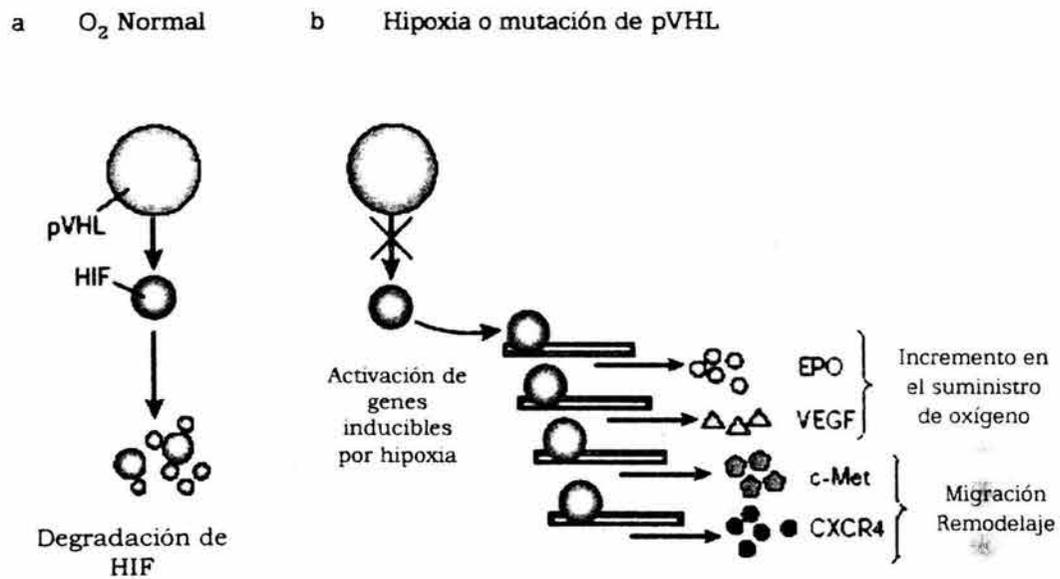


Figura 1 | Respuesta celular a hipoxia. a) Bajo condiciones normales de oxígeno, la proteína pVHL marca a HIF, lo que conduce a su degradación. b) Cuando el oxígeno escasea, o pVHL esta mutada, se incrementan los niveles de HIFs lo que trae como consecuencia la expresión de ciertos genes inducibles por hipoxia, tales como VEGF, EPO, c-Met y CXCR4. Para explicación ver texto. Tomado de Bernards, 2003.

Las primeras etapas de la angiogénesis –formación de vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes, por mitosis de células endoteliales maduras- son definidos por vasodilatación e incremento en la permeabilidad vascular de capilares o venulas post-capilares pre-existentes, en respuesta a VEGF. Esto permite la extravasación de proteínas plasmáticas, que establecen una matriz provisional sobre la cual migrarán células endoteliales. Esto viene acompañado por la pérdida de la cubierta de pericitos, células que están relacionadas a músculo liso vascular,

y que se encuentran rodeando al endotelio (Bergers and Benjamin, 2003). Posteriormente, factores angiogénicos, tales como VEGF y b-FGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico), estimulan a las células endoteliales para inducir la producción y secreción de diferentes proteasas y activadores de plasminógeno tipo urocinasa, que resultan en la degradación de la lámina basal y de matriz extracelular local, permitiendo que las células endoteliales invadan y migren hacia el espacio perivascular en dirección del estímulo angiogénico, ocasionado por interleucina (IL)-8, entre otros (Cross and Claesson-Welsh, 2001; Fidler, 2002b; Bergers and Benjamin, 2003). Subsecuentemente, las células endoteliales proliferan en el borde de la "columna de migración", y comienzan a organizarse en estructuras tridimensionales para formar nuevos vasos sanguíneos. Finalmente, las células endoteliales depositan una nueva lámina basal y secretan varios factores, como PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), que atrae células de apoyo (por ejemplo, pericitos), para asegurar la estabilidad de los nuevos vasos, además de las angiopoietinas y efrinas, que regulan esta estabilidad actuando sobre sus receptores específicos, Tie y Ephr, respectivamente (Cross and Claesson-Welsh, 2001).

Muy poco se sabe acerca de los pasos finales del proceso angiogénico, en los cuales los nuevos vasos sanguíneos se fusionan con otros para formar asas ("loops") y permitir que la sangre circule hacia las nuevas áreas vascularizadas (Bergers and Benjamin, 2003).

Por otra parte, existe evidencia que precursores de células endoteliales (angioblastos) pueden ser movilizados de médula ósea y ser transportados a través de la circulación sanguínea y ser incorporados en las paredes de vasos sanguíneos crecientes (Rafii *et al.*, 2002; Bergers and Benjamin, 2003). Se ha demostrado que diferentes factores que estimulan la angiogénesis, tales como VEGF, PlGF (factor de crecimiento de placenta), y angiopoietina-1 (ANG-1), estimulan este proceso. No obstante, el porcentaje de angioblastos incorporados es generalmente bajo y depende de la naturaleza del tumor, lo que apoya el concepto de que la mayor parte de la neovascularización tumoral ocurre por angiogénesis (Bergers and Benjamin, 2003), y no por vasculogénesis –formación de nuevos vasos sanguíneos

por diferenciación de angioblastos-, tal y como ocurre durante la aparición de vasos en el embrión (Luttun *et al.*, 2002).

### III. METÁSTASIS

Una vez que el diagnóstico del cáncer está hecho, la pregunta más urgente es definir si la enfermedad está localizada o extendida en órganos distantes y/o en nódulos linfoides regionales. Las metástasis –la habilidad de una célula tumoral para invadir tejido normal fuera de sus sitios de crecimiento primario– representa el aspecto más temible del cáncer, ya que a pesar de las mejoras en procedimientos diagnósticos (por ejemplo, la Tomografía Axial Computarizada, CAT; la Resonancia Magnética Nuclear, la MRI; Tomografía de Emisión de Positrones, PET; y de técnicas de ultrasonido avanzadas, entre otras), técnicas quirúrgicas, una mejor atención y cuidado del paciente, y terapias adyuvantes locales y sistémicas, la mayoría de las muertes (~90%) por tumores sólidos son debido a que las metástasis son resistentes a las terapias convencionales (Sporn, 1996). El principal obstáculo para su tratamiento es la heterogeneidad biológica de las células cancerosas. Los neoplasmas primarios y sus metástasis consisten de múltiples poblaciones celulares que presentan un amplio rango de características genéticas, bioquímicas, inmunológicas y biológicas, tales como cariotipo, morfología, propiedades de crecimiento, componentes de superficie celular y receptores, enzimas liberadas y almacenadas, sensibilidad a diferentes agentes terapéuticos, y la habilidad para invadir y metastizar. No obstante, en tumores malignos, la heterogeneidad suele ser más pronunciada que en su contraparte benigna. Como ya se mencionó, esta diversidad puede ser generada rápidamente aún cuando los tumores se originen de una sola célula transformada a través del proceso de evolución tumoral (Fidler and Hart, 1982). Observaciones clínicas de neoplasias han mostrado que los tumores sufren una serie de cambios durante el curso de la enfermedad. Por lo que, un tumor que fue inicialmente diagnosticado como benigno (no invasivo ni metastásico) puede transformarse en un tumor maligno (invasivo y metastásico) después de meses o incluso años. Este fenómeno, denominado progresión tumoral, fue definido por Foulds (1954; 1956), como la adquisición de cambios permanentes irreversibles de una o más características que

se presentan en cada tumor. Generalmente, esta transición de un fenotipo benigno a uno maligno se asocia a mutaciones que generan alelos con pérdida de función en genes supresores de tumores como p53. Además, por si fuera poco, el microambiente órgano-específico puede modificar y/o influir en la respuesta y comportamiento de una célula metastásica a las terapias sistémicas (Fidler, 2002a). Por lo que, un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares que regulan el proceso de la metástasis y de las complejas interacciones entre las células metastásicas y el microambiente del hospedero permitirán establecer y desarrollar mejores terapias para limitar o prevenir la expansión de células tumorales hacia órganos distantes.

### **III.A. FORMACIÓN DE METÁSTASIS**

El proceso de invasión y metástasis es un proceso dinámico y consiste de una serie de pasos interrelacionados que ocurren de manera secuencial, cuya regulación aún se comprende parcialmente (Fig. 2). Para producir lesiones clínicamente relevantes, las células metastásicas deben completar todos los pasos de este proceso. Si las células fallan para completar alguno de estas etapas, son eliminadas. Por lo tanto, las células malignas que eventualmente desarrollarán metástasis habrán sobrevivido a una serie de "eventos" potencialmente letales, cuya superación dependerá de las interacciones entre las propiedades intrínsecas de las células tumorales y de diferentes factores del hospedero cuyo balance puede variar entre diferentes tumores y diferentes pacientes.

Después de las alteraciones iniciales, el crecimiento de las células neoplásicas es progresivo, y el suministro de nutrientes –para la expansión de la masa tumoral- se realiza, inicialmente, por difusión simple (Fig. 2a). Si la masa tumoral es mayor a  $1-2 \text{ mm}^3$ , entonces, la difusión resulta insuficiente y la vascularización se vuelve indispensable. Por tanto, en esta fase la síntesis y secreción de diferentes factores pro-angiogénicos juega un papel clave en el establecimiento de una red neovascular del tejido hospedero (Fig. 2b). Las metástasis comienzan con la separación de células tumorales del tumor primario –proceso conocido como disociación de células tumorales-, las cuales invaden el estroma local del hospedero por diferentes mecanismos. Las células tumorales que han penetrado el

estroma pueden crecer en el sitio de invasión o entrar al torrente sanguíneo. Las vénulas de pared delgada y los canales linfáticos, son los que ofrecen la menor resistencia a la invasión por células tumorales y proporcionan la principal ruta de entrada de las células metastásicas al torrente sanguíneo o linfático (Fig. 2c). Una vez en la circulación, las células tumorales agregadas o en forma individual ("embolia tumoral") deben evadir diferentes mecanismos de la respuesta inmune (por ejemplo, linfocitos, monocitos, células NK, entre otras) y no-inmune (como turbulencia). Gracias al flujo sanguíneo o linfático, las células tumorales que han logrado sobrevivir son distribuidas pasivamente a distintos órganos, donde se propone que se detienen o arrestan en la cama vascular de las vénulas postcapilares de los órganos blanco mediante la adhesión a células endoteliales, a la lámina basal subendotelial que puede estar expuesta, o por restricción de tamaño en capilares pequeños (Fig. 2d). Subsecuentemente, las células tumorales extravasan e invaden el órgano blanco (invasión secundaria), propagándose probablemente por mecanismos similares a los que operan durante la invasión en el sitio primario (Fig. 2e). Finalmente, el crecimiento de una nueva masa tumoral dentro de los órganos blanco completa el proceso metastásico (Fig. 2f). Sin embargo, la invasión no resulta necesariamente en el desarrollo de una metástasis clínicamente relevante, ya que el proceso metastásico puede ser limitado o incluso eliminado en alguno de las etapas anteriores, pudiendo permanecer silencioso por años. La complejidad de la patogénesis de la metástasis explica, en parte, porque el proceso se puede considerar como un evento ineficiente. Se ha demostrado que a pesar de que se liberan millones de células tumorales a la circulación, únicamente el 0.01% de éstas sobrevive y pueden dar origen a un foco metastásico (Fidler, 1970). Además, algunas células tumorales pueden existir en un sitio secundario como células solitarias, pequeñas metástasis pre-angiogénicas, o grandes metástasis vascularizadas, pero solo un pequeño subgrupo continuará con su progresión hacia un foco metastásico, mientras que el resto de las células o micrometástasis entraran a un estado de latencia o morirán. Las células solitarias latente son células que no proliferan ni mueren por apoptosis, mientras que las micrometástasis pre-angiogénicas latentes son cúmulos celulares cuya

proliferación y apoptosis se encuentran equilibradas, por lo que no existe un incremento en el tamaño de la metástasis (Chambers *et al.*, 2002).

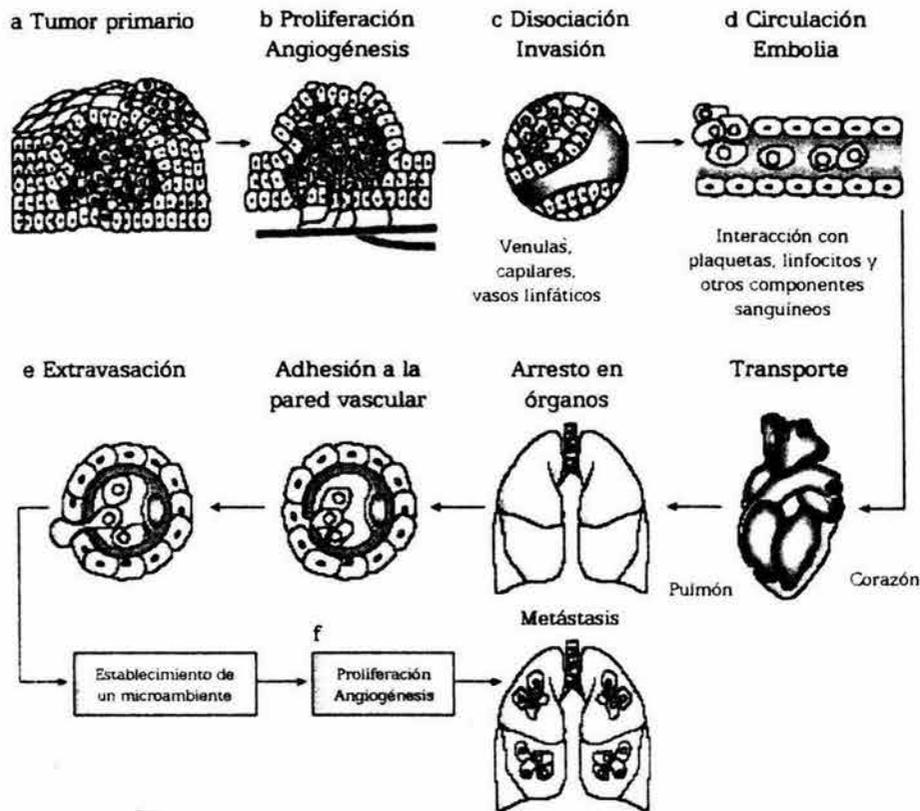


Figura 2 | Principales fases en la formación de metástasis. Para descripción ver texto. Tomado de Fidler, 2003.

De esta forma, para producir lesiones clínicamente relevantes, las células tumorales deben continuar proliferando, desarrollar una red vascular y evadir al sistema inmune. Posteriormente, las células tumorales podrán invadir nuevamente el estroma, penetrar vasos sanguíneos, entrar a la circulación y producir metástasis adicionales.

Por otro lado, observaciones clínicas en pacientes con cáncer y estudios con tumores experimentales han concluido que ciertos tumores producen metástasis en órganos específicos independientemente de la anatomía vascular, velocidad de flujo sanguíneo, y número de células tumorales liberadas a cada órgano. La distribución y destino de células de melanoma, diseminadas hematógicamente, en animales experimentales han demostrado que si bien las células tumorales pueden

alcanzar la microvasculatura de muchos órganos, el crecimiento en el parénquima del órgano se presenta solo en órganos específicos (Fidler, 1970; Sugarbaker, 1979). Tal es el caso de los carcinomas de mama, del tracto gastrointestinal y genitourinario, así como de los sarcomas de hueso y de los tumores trofoblásticos y tiroideos, que metastatizan preferentemente al pulmón (Müller and Respondek, 1990).

### III.B. LA HIPÓTESIS "SEMILLA Y TIERRA"

El concepto de que la formación de metástasis resulta de la interacción de una célula tumoral con un microambiente órgano-específico tiene su origen en la



Figura 3 | Stephen Paget

hipótesis seminal "semilla y tierra" ("seed and soil"), propuesta en 1889, por el cirujano inglés Stephen Paget. Paget analizó más de 900 registros de autopsias de pacientes con diferentes tumores, y observó una alta frecuencia de metástasis en ovarios y la incidencia de metástasis esqueléticas asociadas con diferentes tumores primarios. Estos descubrimientos llevaron a Paget a concluir que la distribución de las metástasis no se debe a un "fenómeno azaroso" (el punto de vista que prevalecía en ese tiempo), sino que las células

tumorales (la "semilla") presentan una "afinidad" o tropismo y dependencia específica por el ambiente de sus órganos blanco (la "tierra"); por tanto, las metástasis sólo se forman cuando la semilla y la tierra son compatibles.

Cuarenta años después, James Ewing (1928) reto la teoría "semilla y tierra" de Paget, y propuso que la diseminación metastásica ocurre, exclusivamente, por factores mecánicos que son el resultado de la estructura anatómica del sistema vascular. El punto de vista de Ewing prevaleció hasta los años 1970s, cuando la naturaleza selectiva de las metástasis fue documentada. En una revisión de estudios clínicos sobre los sitios preferenciales de las metástasis producidas por diferentes tumores humanos, Sugarbaker (1979) concluyó que mientras que las metástasis regionales pueden ser atribuidas a consideraciones anatómicas o mecánicas, tales como la circulación venosa eferente o el drenaje linfático hacia los

nódulos linfoides regionales, las metástasis a órganos distantes son procesos que ocurren en forma órgano-específico.

Datos experimentales que apoyaron la hipótesis "semilla y tierra" de Paget fueron proporcionados por estudios sobre la invasión y crecimiento preferencial de metástasis de células de melanoma B16 en órganos específicos (Hart and Fidler, 1980; Schackert and Fidler, 1988). Diversos experimentos *in vitro*, indicaron que los factores "tierra" pueden tener profundos efectos sobre ciertas subpoblaciones de células tumorales (Fidler, 1995).

#### IV. INVASIÓN

##### IVA. DESPRENDIMIENTO DE CÉLULAS TUMORALES

La invasión y metástasis son procesos patológicos sumamente complejos, y sus determinantes genéticas y bioquímicas todavía no son bien comprendidas. A nivel mecánico estos dos procesos están estrechamente asociados, por ejemplo, en ambas situaciones hay cambios en el acoplamiento físico de las células a su microambiente (por ejemplo, adhesión célula-célula, adhesión célula-matriz, y locomoción activa) y la activación de proteasas extracelulares (Hanahan and Weinberg, 2000). De esta manera, el primer paso y el más importante en la formación de metástasis es el desprendimiento de células tumorales de la masa tumoral primaria (Gabbert *et al.*, 1992).

Este proceso viene acompañado por un cambio previo en el tipo de crecimiento de la masa tumoral, donde las células, pasan de una fase de división sobre un eje radial –u horizontal- a uno de división vertical que anuncia el principio de la invasión. En el caso de los melanomas, el principal parámetro en prognosis, es el grado de espesor y orientación del tumor primario, que es un reflejo de los cambios ocurridos en el crecimiento de las células (Johnson, 1999).

La comprensión de los mecanismos que gobiernan el desprendimiento de las células tumorales es relativamente reciente, a pesar de que en los años 1960s y 1970s se iniciaron los estudios de este fenómeno. Por ejemplo, Criborn *et al.* (1964) –usando un procedimiento de aspiración para remover biopsias de tumor- encontraron que los aspirados de lesiones malignas contenían más células libres que los aspirados de tumores benignos. Sin embargo, estos y otros estudios

anecdóticos sufrieron de una falta de ensayos cualitativos o cuantitativos que pudieran evaluar la magnitud de la separación celular.

Actualmente, se sabe que la integridad de cualquier tejido –incluido el tumoral– es mantenida por interacciones entre células, las cuales son mediadas por moléculas de adhesión (Gumbiner, 1996).

Diferentes clases de proteínas involucradas en el anclaje de las células a su microambiente en un tejido dado están alteradas en células que poseen capacidades invasivas o metastásicas. Las proteínas afectadas incluyen moléculas de adhesión célula-célula (CAMs) –principalmente miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y de la familia de las cadherinas, las cuales median las interacciones célula-célula– e integrinas, que son responsables de las interacciones célula-matriz extracelular (ECM). Todas estas interacciones de adhesión convergen en vías de señalización reguladoras en la célula (Aplin *et al.*, 1998; Giacotti and Ruoslahti, 1999). Una de las moléculas de adhesión comúnmente alteradas en melanomas (Johnson, 1999) y en otros tipos de tumor (por ejemplo, cáncer de páncreas, de mama, gástrico y colorectal, entre otros) (Behrens, 1999; Kurschat and Mauch, 2000; Keleg *et al.*, 2003) es la cadherina-E, una molécula homotípica –dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ – responsable de las interacciones célula-célula que se presenta en forma ubicua en las células epiteliales (de donde deriva su clasificación como de tipo “E”). Se ha observado que muchos carcinomas humanos disminuyen o pierden la expresión o función de la cadherina-E, siendo este un cambio temprano durante el desarrollo de la progresión metastásica. Esta disminución facilita que las células tumorales se liberen de los controles de adhesión de las células vecinas y les permiten separarse de la masa tumoral primaria. Estudios *in vitro*, han indicado que deleciones del dominio citoplásmico de cadherina-E o modificaciones de las diferentes cateninas resultan en una pérdida funcional de la adhesión célula-célula mediada por cadherina-E y/o en el incremento de la movilidad celular (Chen *et al.*, 1997). Por otro lado, estudios *in vivo* han indicado que en la mayoría de los tumores de origen epitelial, se pierde la función de la cadherina-E a través de mecanismos que incluyen mutaciones en la región codificante del gen, inactivación del promotor por hipermetilación, o por proteólisis del dominio extracelular y/o citoplasmático de la proteína (Strathdee, 2002).

Mutaciones en el gen de la  $\beta$ -catenina también se encuentran asociadas a este tipo de tumores (Christofori and Semb, 1999). La expresión forzada de cadherina-E en células de melanoma en cultivo y en modelos de ratones transgénicos, disminuye la capacidad invasiva y de metástasis del tumor, mientras que su inactivación incrementa ambas capacidades (Christofori and Semb, 1999). Debido a ello, se ha propuesto que la cadherina-E funciona como un amplio supresor de invasión y metástasis en cánceres epiteliales, y su eliminación funcional representa un paso importante en la adquisición de esta capacidad (Birchmeier and Behrens, 1994).

Los cambios de expresión de las moléculas de adhesión celular (CAMs) de la superfamilia de las inmunoglobulinas participan también en los mecanismos de invasión y metástasis (Johnson, 1991). En células normales el gen N-CAM, que codifica para una molécula de adhesión homotípica, expresa una isoforma altamente adhesiva, mientras que en células tumorales se expresa una isoforma poco adhesiva o incluso causante de repulsión entre las células, como es el caso de los tumores de Wilms, neuroblastoma y el carcinoma de pulmón de células pequeñas (Johnson, 1991; Kaiser *et al.*, 1996). Al parecer la pérdida de adhesividad de la proteína correlaciona con su grado de sialilación (Rutishauser, 1996), ya que la presencia de ácido siálico disminuye la adhesión a laminina –un componente de ECM–, lo que favorece el desprendimiento de células tumorales y contribuye al comportamiento invasivo de los carcinomas de células pequeñas (Michalides *et al.*, 1994). Además, el nivel de expresión de la proteína se encuentra muy disminuido en carcinomas invasivos de páncreas y colón (Fogar *et al.*, 1997; Keleg *et al.*, 2003). Experimentos en ratones transgénicos apoyan un papel funcional para la forma adhesiva normal de N-CAM en la supresión de metástasis (Perl *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha observado que otros miembros de esta superfamilia, como CEA (antígeno carcino-embriionario), DCC (deletado en cáncer de colón), y MUC18/MCAM, participan en la invasión de tumores (Rosales *et al.*, 1995; Yoshioka *et al.*, 1998; Johnson, 1999). Se ha demostrado que MUC18/MCAM se encuentra sobre-expresada en más del 80% de lesiones metastásicas y que, además, participa en la agregación homotípica en melanomas (Johnson *et al.*, 1996).

Los cambios en la expresión de integrinas y su afinidad por moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas o por componentes de ECM (por ejemplo, laminina, colágena, fibronectina, y vitronectina), también son evidentes en células invasivas y metastásicas. Las integrinas son proteínas heterodiméricas que consisten de dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas de manera no-covalente. Cada subunidad presenta un dominio extracelular, un dominio transmembranal, y un dominio citoplásmico no-catalítico. En algunos tumores la expresión de ciertas integrinas se incrementa, mientras que en otros disminuye.

Se ha observado una reducción en la expresión o una distribución alterada de las subunidades de las integrinas ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 4$ , o  $\alpha 5\beta 1$ ) que actúan como receptores de colágena, fibronectina y laminina en cáncer de colon y glándula mamaria (Hirst *et al.*, 1986; Plantefaber and Hynes, 1989; Varner and Cheresh, 1996; Mizejewski, 1999).

Por otra parte, los distintos microambientes invadidos influyen en las respuestas de las células malignas. De acuerdo con ello, la colonización exitosa de estos nuevos sitios –tanto distantes como locales– requiere de una adaptación, la cual es lograda a través de cambios en el espectro de las subunidades y de las integrinas que son expresadas por las células invasoras. Estos nuevos cambios resultan en diferentes subtipos de integrinas que presentan distintas preferencias por sustratos. Las células de carcinoma facilitan la invasión mediante un cambio en la expresión de sus integrinas que se unen preferencialmente a nuevos componentes de matriz extracelular generados por proteasas extracelulares, mientras que otras integrinas (por ejemplo,  $\alpha 3\beta 1$  y  $\alpha v\beta 3$ ) se unen a la matriz extracelular presente en epitelios normales (Varner and Cheresh, 1996; Lukashev and Werb, 1998). La expresión forzada de las integrinas fisiológicas en las células tumorales bloquea la formación de metástasis, que es consistente con un papel de estos receptores que actúan como determinantes centrales de estos procesos (Varner and Cheresh, 1996; Hood and Cheresh, 2002).

#### **IVB. PROTEÓLISIS EN INVASIÓN Y METÁSTASIS**

En los últimos años, ha aumentado considerablemente el interés en identificar aquellas moléculas involucradas en la degradación proteolítica de la matriz

extracelular. Durante el proceso de invasión, las células tumorales tienen que cruzar la matriz intersticial que está compuesta de glicoproteínas, proteoglicanos y proteínas filamentosas. Uno de los principales hallazgos, ha sido la participación de diversas cascadas de reacciones proteolíticas en los procesos de invasión y metástasis (Kurschat and Mauch, 2000). En dichas cascadas participan cuatro clases de proteasas: serin-, cistil-, aspartil-, y metalo-proteasas de matriz (MMPs); siendo éstas últimas las más estudiadas, debido a su participación en el paso inicial de la degradación de la matriz extracelular (Stetler-Stevenson and Yu, 2001).

Con excepción de las MMPs que contienen la secuencia RXKR (Arg-X-Lys-Arg) (estromelisina-3 y MT-MMPs), todos los integrantes de esta familia son secretadas como zimógenos inactivos que son activados en el medio extracelular por un sistema activador de plasminógeno-plasminógeno o por otro miembro de la familia de las MMPs. Una vez activadas, las MMPs son fuertemente reguladas por TIMPs (inhibidor tisular de las MMPs) –en una estequiometría 1:1- en el ambiente extracelular o por  $\alpha_2$ -macroglobulina en el plasma (Stetler-Stevenson and Yu, 2001).

#### *El papel de las MMPs en cáncer*

Las primeras observaciones acerca de la importancia de las MMPs en la invasión y la metástasis fueron realizadas por Liotta *et al.* (1979), al reportar que una enzima secretada por células de melanoma era capaz de degradar colágena, un componente de las laminas basales. Este descubrimiento fue seguido por numerosos estudios donde se demuestra una correlación entre la expresión de MMPs en tumores y su capacidad de invasión y de generar metástasis. De esta forma, se ha demostrado un incremento en la expresión de MMP-2 (gelatinasa A, 72 KDa) y MMP-9 (gelatinasa B, 92 KDa) en diferentes tumores humanos (ambas MMPs tienen las actividades más elevadas en contra de colágena tipo IV, el principal constituyente de las láminas basales). También se ha detectado el incremento de colagenasas intersticiales, estromelisina-2 y -3, matrilisina, y MT1-MMP en diferentes tumores (Nelson *et al.*, 2000; Stetler-Stevenson and Yu, 2001). Todas estas enzimas son capaces de degradar moléculas de matriz extracelular (por ejemplo, laminina, fibronectina, y vitronectina, entre otras), proteoglicanos,

glicoproteínas y varios tipos de colágena. Además, las metaloproteasas membranales activan a la gelatinasa B y funcionan como receptores para la gelatinasa A, induciendo de manera eficiente la proteólisis pericelular (Yamamoto *et al.*, 1996). En algunos casos el nivel de expresión ha sido correlacionado con el grado de progresión tumoral o estado clínico (Stetler-Stevenson and Yu, 2001).

### *Serina-proteasas en cáncer*

Dentro de la familia de las serina-proteasas, los activadores de plasminógeno están directa e indirectamente involucrados en la degradación de la matriz extracelular. Los activadores de plasminógeno son proteasas que convierten específicamente el plasminógeno inactivo a plasmina activa, una enzima que tiene una amplia especificidad de sustratos (por ejemplo, fibrina, fibronectina, colágena tipo IV, vitronectina y laminina) (Roldan *et al.*, 1990). La plasmina también tiene la capacidad de activar colagenasa latente y pro-activadores de plasminógeno (Liotta *et al.*, 1991).

Existen dos tipos de activadores de plasminógeno, el activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) y el activador de plasminógeno tipo tisular (tPA). El tipo urocinasa está involucrado directamente en la degradación de proteínas de matriz extracelular durante procesos de remodelación tisular, mientras que el tipo tisular esta involucrado en la disolución de coágulos en los vasos sanguíneos y en el mantenimiento de la homeostasis vascular (Bachmann and Kruithof, 1984; Blasi, 1993; Gething *et al.*, 1988; Saksela and Rifkin, 1988). Sin embargo, el papel que desempeña el tPA en el desarrollo del cáncer es controversial. Se sabe que el tipo tisular está ausente en la metástasis de glioblastoma, así como en tumores de colon, pulmón, y mama (Hajjar and Hamel, 1990; Saito *et al.*, 1990). En el caso de uPA se ha detectado un incremento en su actividad en tumores primarios así como en metástasis de melanoma, encontrándose principalmente en el frente invasivo (Kurschat and Mauch, 2000).

Por otro lado, en muchos tumores las proteasas que degradan la matriz extracelular no son producidas por las células tumorales sino por células del estroma y células inflamatorias (Werb, 1997). Una vez liberadas por estas células, las proteasas pueden ser manipuladas por células tumorales. De esta forma,

células de carcinoma pueden inducir la expresión de uPA y su subsecuente unión al receptor de superficie uPAR produciendo la activación proteolítica del plasminógeno (Stoppelli *et al.*, 1985; Vassalli *et al.*, 1985; Mignatti and Rifkin, 1993; Foekens *et al.*, 2000).

#### **IVC. LOCOMOCIÓN ACTIVA**

Un requisito para que las células tumorales invadan el tejido circundante y la matriz extracelular (ECM) es tener la capacidad de locomoción activa. Para poder extenderse hacia otros tejidos, las células tumorales usan mecanismos de migración similares, si no idénticos, a los que ocurren en células normales no-neoplásicas durante procesos fisiológicos tales como morfogénesis embrionaria, cicatrización de una herida y el tráfico de células inmunes (Lauffenburger and Horwitz, 1996).

Estudios recientes indican que la privación de oxígeno podría incrementar la capacidad de motilidad de células tumorales. Pennacchietti *et al.* (2003) encontraron que la hipoxia incrementa la expresión de genes asociados a la migración celular, tales como c-Met, una proteína-receptor que incrementa la motilidad e invasión celular por medio de la unión a su ligando, HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) (Fig. 4).

##### *Proceso de migración*

Durante el proceso de migración, la célula debe modificar su forma y rigidez para interactuar con estructuras tisulares. Durante este proceso, la matriz extracelular proporciona el sustrato y la barrera que deben superar las células en movimiento. La migración resulta de un ciclo continuo de pasos interdependientes (Lauffenburger and Horwitz, 1996). El movimiento celular comienza con la elongación y polarización de la célula. Entonces un pseudópodo es formado, por medio de la extensión del "borde guía" de la célula, el cual se adhiere a la matriz extracelular a través de moléculas de adhesión e inicia la formación de uniones de adhesión focal unidos al citoesqueleto de actina. Subsecuentemente, ciertas regiones del "borde guía" se contraen, de manera que se generan las fuerzas de tracción necesarias para guiar el movimiento de la célula hacia adelante y arrastrar

su "borde posterior", resultando en el desplazamiento de la célula (Friedl and Wolf, 2003). Las moléculas de adhesión liberadas del sustrato son internalizadas por medio de vesículas endocíticas para ser recicladas hacia el "borde guía" o depositarlas en nuevos sustratos (Friedl and Wolf, 2003).

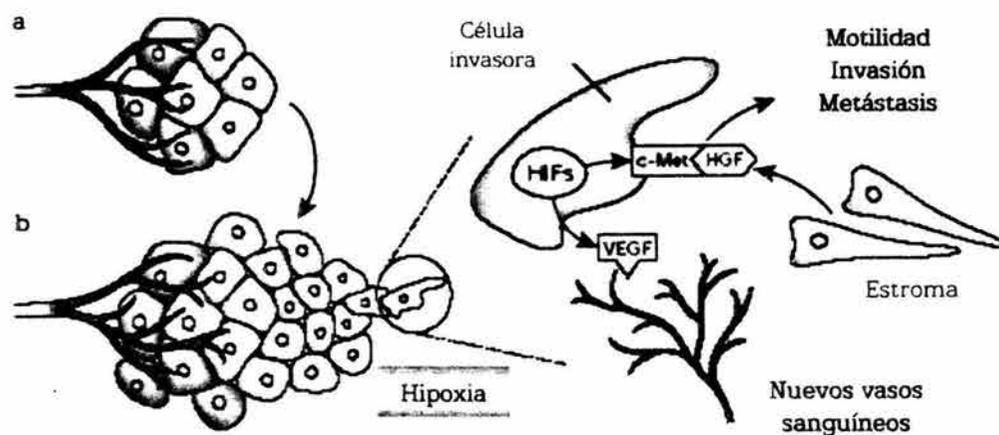


Figura 4 | Escape de células tumorales a la falta de oxígeno. a) En este estado el crecimiento tumoral es apoyado con nutrientes y oxígeno por su propio suministro sanguíneo. b) Si la masa tumoral es mayor a  $1-2 \text{ mm}^3$ , las células del frente celular entrarán a un estado de hipoxia. Al sentir bajos niveles de oxígeno los HIFs estimulan la producción de VEGF, una proteína que atrae nuevos vasos sanguíneos. HIF también incrementa los niveles de c-Met, una proteína que al unirse a HGF, trae como consecuencia un incremento en la motilidad, invasión y metástasis celular. Tomado de Bottaro and Liotta, 2003.

#### *Diversidad de la migración tumoral*

Una pregunta frecuente en la invasión tumoral es, ¿cómo se organizan las células tumorales después de su entrada al torrente sanguíneo y/o linfático? Observaciones *in vivo* e *in vitro* han mostrado que las células tumorales se infiltran de diferentes maneras. Por ejemplo, las células pueden diseminarse como células individuales, referida como "migración de células individuales", o expandirse en filamentos, y/o en agregados celulares, denominada "migración colectiva" (Friedl and Wolf, 2003). En muchos tumores, ambas situaciones se presentan de manera simultánea. Sin embargo, en leucemias, linfomas y sarcomas, se diseminan como células individuales. Por otro lado, los tumores epiteliales comúnmente emplean mecanismos de migración colectiva. (Thiery, 2002). Tales diferencias en los

patrones de migración reflejan variaciones en el repertorio molecular utilizado por las células tumorales.

## V. INTRAVASACIÓN, ARRESTO Y EXTRAVASACIÓN

Después de haber cruzado exitosamente la matriz extracelular, las células tumorales entran al sistema vascular para diseminarse hacia nuevos órganos, un paso denominado intravasación. Este paso requiere de una secuencia coordinada de proteólisis y locomoción activa. Evidencia reciente indica la existencia de diferencias importantes en la intravasación de células metastásicas y no-metastásicas dentro de un tumor primario. Se ha observado que las células metastásicas se orientan y elongan hacia los vasos sanguíneos, mientras que las células no-metastásicas se asocian aleatoriamente, y su elongación es independiente de la posición de los vasos sanguíneos. Esto sugiere que la orientación celular puede ser inducida por quimioatracción de los vasos sanguíneos (Wyckoff *et al.*, 2000).

El análisis estructural de tumores primarios sugiere que, la entrada directa de células tumorales a los vasos sanguíneos está confinada a pequeñas venas y microvasculatura. Otros vasos, como las grandes venas, también pueden ser invadidas, pero la invasión arterial se presenta raramente (Weiss *et al.*, 1988). Existen reportes donde se ha demostrado que en algunos tumores (por ejemplo, sarcomas), la sangre es transportada por hendiduras vasculares, las cuales están revestidas por células tumorales, más que por endotelio. En estos tumores, la invasión no requiere de la degradación previa de las láminas basales. Sin embargo, el proceso de disociación tumoral deberá ser apoyado por la acción de enzimas proteolíticas (Weiss and Ward, 1983). En algunos sitios anatómicos y/o en algunos tumores desdiferenciados, las láminas basales pueden ser muy delgadas y estar desprovistas de colágena (Weidner, 2002). Por ejemplo, en el pulmón, el grosor combinado del epitelio alveolar, lámina basal, y endotelio capilar es de solo 100  $\mu\text{m}$ . Además, la neovasculatura tumoral tiende a ser fenestrada, débil y hemorrágica, esto último, debido en parte a la sobre-producción de VEGF (Bergers and Benjamín, 2003). Asimismo, la intravasación en estos vasos puede requerir mucha menos degradación que la intravasación en vasos normales (Weidner,

2002). Las células tumorales también pueden entrar a la circulación sanguínea en las conexiones linfático-venosas, después de haber entrado a los capilares linfáticos. Interesantemente, ninguna de estas estructuras presenta láminas basales (Weiss *et al.*, 1988). Recientemente, Sugino *et al.* (2002) mostraron que, en algunos modelos, las células metastásicas pueden ganar acceso a los vasos sanguíneos por intravasación de "nidos de células tumorales" rodeados por células endoteliales vasculares, seguido por un crecimiento intravascular del tumor sin la penetración de la pared vascular.

En diferentes estudios se ha encontrado que la eficiencia de la invasión vascular tiene un gran impacto en el curso que sigue la progresión metastásica. Es decir, pacientes a los cuales se les detecta invasión de vasos sanguíneos o linfáticos durante la cirugía tienen una peor prognosis que pacientes sin invasión vascular (Gabbert *et al.*, 1991).

Después de haber entrado a la vasculatura, las células tumorales agregadas o individuales evaden diferentes mecanismos de la respuesta inmune (por ejemplo, la acción de linfocitos T y B, neutrófilos, macrófagos y células asesinas NK), y del ambiente vascular (como turbulencia). Gracias al flujo sanguíneo o linfático, las células metastásicas son diseminadas pasivamente hacia órganos y tejidos distantes donde formaran lesiones secundarias. Se ha propuesto que las células arrestan en la cama vascular de las venas post-capilares de los órganos blanco, mediante su adhesión a células endoteliales –y a la lámina basal sub-endotelial que puede estar expuesta–, o por restricción de tamaño en capilares pequeños (Chambers *et al.*, 1995; Thorlacius *et al.*, 1997; Glinsky, 1998). Estas dos teorías que describen las metástasis tumorales –la hipótesis de la adhesión (o también "semilla y tierra") y la teoría del arresto mecánico–, enfatizan la adhesión heterotípica de células tumorales con el endotelio de vasos sanguíneos y la agregación homotípica de células tumorales como componentes clave de la cascada metastásica, respectivamente (Glinsky, 1998).

La adhesión heterotípica de células tumorales con el endotelio vascular, que resulta en el arresto de las células tumorales a la vasculatura de los órganos blanco, es un paso esencial en la diseminación metastásica (Orr and Wang, 2001). Recientes observaciones, realizadas con microscopia intravital, sugieren que las

metástasis se originan a partir del crecimiento intravascular de células tumorales adheridas al endotelio más que de células extravasadas (Al-Madhi *et al.*, 2000).

Estos resultados resaltan la importancia de la adhesión intercelular en la metástasis tumoral. No obstante, para que esto se lleve a cabo, se requiere que el endotelio se encuentre activado, lo que le permite expresar en su superficie moléculas de adhesión necesarias para la interacción heterotípica célula tumoral-célula endotelial y que sirve de base para la extravasación tumoral (Lollini *et al.*, 1990; Orosz *et al.*, 1993; Stoelcker *et al.*, 1996).

Por otro lado, el sitio de arresto de las células tumorales es uno de los factores que contribuyen a las metástasis órgano-específico (Hart and Fidler, 1980; Schackert and Fidler, 1988), y se ha propuesto que involucra interacciones específicas entre la superficie de la célula tumoral circulante ("la semilla") y el endotelio o el sub-endotelio ("la tierra"). También, se ha propuesto que la especificidad se debe a las diferencias antigénicas entre distintas partes del árbol vascular de diferentes órganos (Auerbach *et al.*, 1985). Sin embargo, no se puede afirmar que la especificidad por ciertos órganos se deba sólo a la capacidad de interacción entre células tumorales y el endotelio vascular, sino que también involucra la expresión de factores atrayentes –tales como quimiocinas y sus receptores (por ejemplo, CXCL12/CXCR4 y CCL21/CCR7) ("teoría de la quimioatracción")-, de sobrevivencia y/o proliferación que contribuyen a crear un microambiente específico que resulta favorable para el desarrollo de un tumor secundario o metástasis (Liotta, 2001; Müller *et al.*, 2001).

Por otra parte, después de la interacción célula tumoral-endotelio, las células metastásicas se extienden a lo largo de la pared vascular, para posteriormente extravasarse hacia el parénquima de los órganos blanco –donde finalmente proliferarán- mediante pasos secuenciales de proteólisis, adhesión célula-sustrato y locomoción activa; procesos que se llevan a cabo de manera similar a como se realizaron durante los procesos de intravasación e interacción con la matriz extracelular (Engers and Gabbert, 2000).

## **ANTECEDENTES**

### **VI. INTERACCIONES ENTRE CÉLULAS TUMORALES Y EL ENDOTELIO VASCULAR DURANTE LA METÁSTASIS**

Cómo se mencionó anteriormente, los vasos sanguíneos y linfáticos constituyen las principales vías anatómicas de diseminación de células tumorales. Dentro de los vasos, las células metastásicas interactúan con diferentes constituyentes celulares y humorales de la sangre y con el endotelio vascular. Se ha propuesto que este último tipo de interacción (célula tumoral-célula endotelial), juega un papel significativo en el destino de las células metastásicas, ya que media el arresto de las células tumorales en la micro-vasculatura de los órganos blanco, y por tanto es un paso esencial y limitante en la cascada metastásica (Orr and Wang, 2001).

El modelo actual de adhesión de células tumorales a la microvasculatura describe un proceso con múltiples pasos y componentes que participan de manera secuencial –análogo al proceso de adhesión de leucocitos durante la reacción inflamatoria- que incluye cambios en la adhesividad del endotelio (“priming” o activación), adhesión reversible inicial de células tumorales al endotelio (“rolling” y “docking”), adhesión irreversible que involucra interacciones proteína-proteína (“locking”), seguido por extravasación y/o proliferación en el tejido blanco (Cooper and Pienta, 2000; Orr *et al.*, 2000).

La evidencia acumulada, indica que una amplia variedad de moléculas de adhesión tales como lectinas, cadherinas, inmunoglobulinas e integrinas participan en diferentes etapas de este proceso. Sin embargo, la combinación única de moléculas de adhesión expresadas en la membrana de las células endoteliales y sus contrapartes expresadas en la membrana de las células tumorales puede predeterminar, por tanto, el resultado final de la adhesión y del proceso metastásico (Cooper and Pienta, 2000).

### **VIA. CONTACTO CÉLULA TUMORAL-ENDOTELIO**

De manera análoga a los leucocitos, las células tumorales tienen que interactuar con la pared vascular de los vasos sanguíneos para disminuir su velocidad y poder adherirse al endotelio y extravasarse. Durante la fase reversible, los contactos

iniciales entre las células tumorales y el endotelio vascular son débiles y temporales, y se basan principalmente en interacciones de tipo carbohidrato-carbohidrato y carbohidrato-lectina (por ejemplo, antígeno T-galectina-3) presentes en moléculas de adhesión de ambos tipos celulares (Glinsky *et al.*, 2001). Se cree que esta interacción, inicia la activación tanto del endotelio como de las células tumorales a través de citocinas, radicales libres, lípidos bioactivos y factores de crecimiento. Estos mediadores ocasionan la expresión de moléculas de adhesión inducibles en ambos tipos celulares reforzando las uniones iniciales (Orr *et al.*, 2000).

En este estado, los contactos con las células endoteliales (EC) juegan un papel crucial, y diferentes estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han confirmado que las selectinas (en particular las selectinas -E y -P) —expresadas en la superficie celular de EC activadas— participan en el “rolling” y “docking” (o adhesión reversible) de células tumorales con el endotelio vascular (Tözeren *et al.*, 1995; Krause and Turner, 1999; Borsig *et al.*, 2002). Además, diferentes trabajos han documentado que a pesar de que las células tumorales muestran una adhesión basal a las células endoteliales no activadas, la adhesión aumenta notablemente cuando las células endoteliales son estimuladas con citocinas pro-inflamatorias (tales como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) (Iwai *et al.*, 1993; Estrada *et al.*, 2003), y cuando las células tumorales expresan el complejo de glicosilación denominado sialil-Lewis-A y sialil-Lewis-X (sLe<sup>a</sup> y sLe<sup>x</sup>), los ligandos de selectina-E (Kannagi, 1997; Renkonen *et al.*, 1997). Otras moléculas que se expresan en la superficie de células tumorales, tales como CD24, también median las interacciones con selectinas, por ejemplo, con la selectina-P (Aigner *et al.*, 1998). Se ha reconocido un subgrupo de cáncer de colon en humanos que expresa sLe<sup>a</sup> y sLe<sup>x</sup> y que cursa con un mal pronóstico, en donde el tratamiento con drogas que interfieren con la expresión de selectina-E disminuyen el riesgo de la formación de metástasis (Kannagi, 1997; Renkonen *et al.*, 1997).

Resultados similares se han obtenido en estudios en los que se ha analizado la participación de diferentes moléculas de adhesión intercelular (por ejemplo, ICAM-1 en la adhesión de células de gliomas) (Tamaki *et al.*, 1995), y de adhesión vascular (por ejemplo, VCAM-1 en la adhesión de melanomas) (Vidal-Vanaclocha *et*

*al.*, 2000). En estos casos es necesaria la expresión de integrinas que funcionan como contra-receptores específicos para estas moléculas. Se ha demostrado que la expresión de ciertas integrinas (por ejemplo,  $\alpha3\alpha5$ ,  $\beta1$ ,  $\beta4$  y  $\alpha\nu\beta3$ ), están involucradas en la fase vascular de la metástasis (Cooper and Pienta, 2000; Voura *et al.*, 2001; Brooksbank, 2002); lo que apoya la teoría de un proceso bifásico, en el que las selectinas y carbohidratos son responsables del "rolling" y arresto inicial ("docking"), mientras que las integrinas y sus co-receptores regulan la adhesión tardía e irreversible ("locking"). Además, se ha observado que ciertos péptidos que contienen la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) bloquean la adhesión mediada por integrinas de diferentes líneas tumorales al endotelio (Cooper and Pienta, 2000).

#### **VIB. MIGRACIÓN TRANSENDOTELIAL**

Los mecanismos de adhesión intercelular que median y controlan los contactos entre las células endoteliales, le permiten al endotelio funcionar como un epitelio impermeable y formar una barrera selectiva entre los compartimentos intravascular y extravascular. La integridad del endotelio vascular depende ampliamente de la organización de sus uniones intercelulares. Estas uniones están formadas por la interacción homofílica de los dominios extracelulares de una proteína transmembranal denominada cadherina del endotelio vascular (VE-cadherina) (Vestweber, 2002). Durante el proceso de metástasis, las células tumorales tienen que interrumpir estas uniones intercelulares para poder migrar a través del endotelio.

Diferentes estudios indican que durante la extravasación de células tumorales participan en forma activa los dos tipos celulares involucrados (las células endoteliales y las células metastásicas). Este proceso se caracteriza por la reorganización del citoesqueleto de actina y cambios dinámicos en la forma de la célula (Voura *et al.*, 1998a), así como por la redistribución de VE-cadherina, vinculina y de moléculas de adhesión intercelular endotelial como JAM-1 en células endoteliales (Lewalle *et al.*, 1997). La penetración del endotelio es iniciada por la formación de filipodios y pseudópodos en la parte basal de la célula tumoral, ocasionando el desarrollo de microfilamentos en el citoplasma de la célula endotelial. Estas interacciones adhesivas llevan a una redistribución de VE-

cadherina, vinculina, galectina-3, JAM-1 y de PECAM-1. Se ha observado que, mientras la VE-cadherina está ausente de los contactos entre células tumorales y células endoteliales (Lewalle *et al.*, 1997), la galectina-3 se localiza en los sitios de contacto heterotípico (Khaldoyanidi *et al.*, 2003).

La penetración de pseudópodos en las regiones interendoteliales, conduce a la retracción de las células endoteliales para proveer el espacio necesario para que la célula tumoral pueda extravasarse; esta retracción no elimina las interacciones célula tumoral-endotelio (Voura *et al.*, 1998b). No obstante, existen controversias respecto a la viabilidad endotelial en el momento de su retracción, ya que mientras algunos autores reportan que las células endoteliales sufren un daño irreversible que las lleva inevitablemente a la apoptosis (Heyder *et al.*, 2002), otros reportan que la retracción es reversible y temporal sin daños aparentes (Tang *et al.*, 1993; Honn *et al.*, 1994).

Por otra parte, evidencia experimental sugiere que las membranas de ambos tipos celulares permanecen en estrecho contacto durante todo el proceso de trans migración, a través de interacciones heterotípicas, formando uniones estrechas impermeables (Khaldoyanidi *et al.*, 2003). El mecanismo por el cual se induce la retracción de células endoteliales aún se desconoce, sin embargo, puede ser facilitado por el contacto inicial que ocasiona la disolución de uniones estrechas y desmosomas. Evidencias recientes, sugieren la formación de uniones espaciadas "gap" que se forman en los sitios de contacto entre células endoteliales y células tumorales (el-Sabban and Pauli, 1991; 1994). Se ha postulado que el ácido 12(S)-hidroxieicosatetraenoico, 12(S)-HETE, un metabolito producto de la actividad de la lipoxigenasa sobre el ácido araquidónico, puede ser liberado directamente en los sitios de interacción célula-célula o ser transferido a través de las uniones comunicantes tipo "gap" de la célula tumoral hacia la célula endotelial. Se postula que esto induce la retracción del endotelio (Honn *et al.*, 1994), y la expresión de la integrina  $\alpha v \beta 3$ , disparando así, un re-arreglo del citoesqueleto de actina dependiente de la cinasa de proteínas PKC (Tang *et al.*, 1993; 1994).

Después de haber hecho contacto con la lámina basal sub-endotelial, las células tumorales comienzan a extenderse; proceso que requiere de integrinas, las cuales se unen a componentes de matriz extracelular. Para sellar el espacio dejado por el

paso de la célula tumoral, las células endoteliales adyacentes reorganizan su citoesqueleto y proyectan lamelipodios que se extienden sobre la superficie apical de las células tumorales. La VE-cadherina y PECAM-1 reaparecen cuando la célula endotelial comienza el proceso que restablecerá sus uniones intercelulares (Voura *et al.*, 1998b).

## VII. MODELOS QUE HAN PERMITIDO ESTUDIAR LAS INTERACCIONES CÉLULA TUMORAL-ENDOTELIO

Como ya se indicó, el modelo actual de adhesión de células tumorales a la microvasculatura –durante la metástasis– describe un proceso de múltiples etapas y secuenciales en las que participan múltiples componentes, análogo al proceso de adhesión de leucocitos durante la reacción inflamatoria. Sin embargo, dado que esta fase de la metástasis ocurre *in vivo* ha sido difícil estudiar las interacciones célula tumoral-endotelio. Hasta el momento, se han desarrollado diferentes aproximaciones experimentales para estudiar aspectos particulares de la metástasis, incluyendo una variedad de ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Las aproximaciones *in vivo* incluyen el desarrollo de metástasis “espontánea” y “experimental” en animales inmunodeficientes o singénicos (Paris *et al.*, 1999). En estos ensayos, líneas de células tumorales son inyectadas en un tejido dado para formar un tumor primario, o directamente en la circulación sanguínea o linfática, con la subsiguiente formación de metástasis. El punto final de estos ensayos es contar el número de metástasis en diferentes órganos. Estos ensayos permiten determinar los efectos de distintas manipulaciones genéticas y moleculares, probar la eficacia de fármacos anti-metastásicos y además, permiten una asociación entre ciertas propiedades o moléculas específicas y el fenotipo metastásico (Yang *et al.*, 1999; 2002). Para poder observar el desarrollo de una metástasis *in vivo*, se ha desarrollado la técnica de microscopía intravital (Chambers *et al.*, 1995). No obstante, estas técnicas tienen la limitante de proporcionar poca o ninguna información acerca de las moléculas que participan en la adhesión intercelular. Además, el tejido murino (el modelo experimental de más usado) puede presentar diferencias en la microvasculatura, bioquímica celular y propiedades antigénicas respecto al tejido humano.

Los ensayos *in vitro* (estáticos y en cámaras de flujo) han medido la habilidad de diferentes células tumorales para adherirse, migrar o invadir monocapas de células endoteliales –estimuladas o no con citocinas pro-inflamatorias- y/o moléculas de lámina basal. Estos ensayos han permitido la identificación de moléculas que están asociadas con la habilidad para llevar a cabo estos procesos (Kramer and Nicolson, 1979; Giavazzi *et al.*, 1993; Patton *et al.*, 1993; Simiantonaki *et al.*, 2002; Pu *et al.*, 2002). Nuestro grupo ha empleado estos modelos para documentar que las células tumorales humanas de linfomas, cáncer cérvico uterino y de glándula mamaria secretan factores capaces de modificar el fenotipo endotelial incrementado notablemente su adhesividad por células tumorales (Estrada *et al.*, 2003; Montes 2003). Sin embargo, estos modelos carecen de un sincicio endotelial funcional que se encuentre sobre su lámina basal nativa, además de otros componentes de matriz extracelular que pudieran ser relevantes para la función endotelial *in vivo*, como pudiera ser la interacción con pericitos y con las células de músculo liso. De hecho, esta bien documentado que el fenotipo endotelial *in vitro* difiere del observado *in vivo* (Augustin *et al.*, 1994), debido –principalmente- a dos razones: (i) las células endoteliales en cultivo son estimuladas continuamente con medio de cultivo rico en nutrientes y mitógenos lo que trae como consecuencia su proliferación, contrario al estado quiescente *in vivo* en el que se encuentran y, (ii) al hecho de que las células en cultivo no se encuentran expuestas a la fuerza de rozamiento o "shear stress". Estas diferencias deben tener efectos en la fisiología endotelial y en la expresión génica (Gimbrone, 1997; Chen *et al.*, 2001; McCormick *et al.*, 2001).

Todas estas aproximaciones –*in vivo* e *in vitro*- han proporcionado una cantidad importante de información, y algunos procesos de adhesión comienzan a ser entendidos. Sin embargo, la hipótesis de la interacción mediada por receptores, responsable del arresto de células tumorales a la vasculatura, necesita ser verificada en un vaso sanguíneo humano integro. Por ello, tratar de mantener el microambiente original y un flujo hemodinámico debiera permitir el establecimiento de modelos de estudio de los procesos celulares y moleculares relevantes para la adhesión y la invasión metastásica. Los sistemas de perfusión *ex vivo* parecen un buen modelo para estudiar las interacciones célula tumoral-endotelio bajo condiciones más cercanas a lo fisiológico.

## VIII. PERFUSIÓN

El término Perfusión se deriva del vocablo francés "perfuse" que significa "a través de." Históricamente, la perfusión fue inicialmente concebida para estudiar un órgano aislado del organismo; sin que sea claro quien realizó la primera perfusión. Es probable que el médico francés Julien Jean César Legallois realizará las primeras perfusiones de un órgano. Aproximadamente en 1812, Legallois desarrolló una primitiva preparación de "pulmón-corazón" aislada de conejos en la cual ligó la vena cava inferior, aorta, arterias carótidas, y venas yugulares, y ventilara los pulmones a través de una jeringa insertada en la traquea de un conejo decapitado (Fye, 1995; DeBakey, 2000). En el curso de estos experimentos, él hizo una observación que anticipó el desarrollo de la maquina "corazón-pulmón" (que se emplea actualmente durante los trasplantes) cerca de 150 años: "Si el lugar del corazón pudiera ser abastecido por inyección, y si, por el mantenimiento continuó de esta inyección pudiera suministrarse una cantidad de sangre arterial... entonces la vida podría ser mantenida indefinidamente." Con esta observación, se sentaron las bases de los principios de la circulación artificial (von Segesser, 1997). Este descubrimiento fue seguido por numerosos estudios, entre los que sobresalen los realizados por Claude Bernard (~1854), Carl Ludwig (1865), y Newell Martin (~1883) (Fye, 1986; 1991; Fuchs and Netz, 2002). Ludwig en la Universidad de Leipzig, y Martin en "John Hopkins University", desarrollaron y refinaron técnicas para perfundir órganos aislados. Esto hizo posible estudiar las funciones de órganos denervados que fueron perfundidos con sangre o soluciones que contenían diferentes componentes. Un modelo experimental que Ludwig desarrolló fue una preparación de corazón de rana aislado, en el cual el órgano pudo continuar latiendo durante horas por perfusión con sangre defibrinada. Este modelo consistía de cánulas insertadas en la aorta y vena cava inferior, a través de las cuales suero canino era perfundido. Con este método, el corazón de rana aislado retenía su actividad hasta por 24 h si el suero era cambiado periódicamente (Fye, 1986; 1991).

No obstante, fue N. Martin quien desarrolló las primeras técnicas para perfundir órganos de mamíferos. Sin embargo, a finales del siglo XIX, la contribución más importante vino de estudios realizados por Oscar Langendorff. Langendorff fue un

investigador activo en el Instituto de Fisiología en Rostock, Prussia, donde realizó una gran variedad de experimentos fisiológicos, tales como la respiración Cheynes-Stokes, diabetes, fisiología de la digestión, funciones del nervio vagal, entre otros (Marsh, 1979). Sin embargo, Langendorff es recordado principalmente por su trabajo acerca de la perfusión del corazón aislado de mamíferos. Muchos investigadores intentaron perfundir el corazón de rana, y examinaron el corazón de mamíferos *in situ* y *ex vivo* sin gran éxito (Waller and Waymouth Reid, 1887; Marsh, 1979). Pero fue Oscar Langendorff quien, en Febrero de 1895, realizó la primera perfusión retrograda del corazón que permitió investigar la actividad mecánica de este órgano completamente aislado. El principio fundamental es la fuerza sanguínea, o cualquier otro fluido oxigenado que sea apropiado para mantener la actividad cardiaca, que se dirija hacia el corazón por medio de una cánula insertada en la aorta ascendente. Al inicio, Langendorff empleo este método solo para registrar el funcionamiento contráctil del corazón, y reportó algunos experimentos toxicológicos empleando atropina, muscarina y cloruro de potasio. Posteriormente, investigó la influencia de la temperatura y la reacción del corazón al estímulo eléctrico (con esta observación se sentaron las bases de los principios de la resucitación artificial) (1897). En 1899, reportó el flujo coronario fásico y su relación con la acción rítmica del músculo cardiaco.

La preparación "Langendorff" fue generalmente aceptada por fisiólogos y farmacólogos en el cambio de siglo, ya que una de las mayores virtudes de estas preparaciones es la posibilidad de imponer un cierto grado de control sobre el estudio experimental. Desde entonces la perfusión de órganos ha sido ampliamente utilizada en estudios de metabolismo, y son muy valiosos los resultados obtenidos con la adición de diferentes sustancias al líquido de perfusión, y a la determinación consecutiva en el mismo de los productos intermediarios (Mortimore and Tietze, 1959a; Mortimore *et al.*, 1959b; Mortimore, 1961; Papaikonomou, 1977; Sibley and Whitehouse, 1979). Además, la perfusión no sólo ha sido empleada en estudios de metabolismo, sino también para la obtención de diferentes células, tales como hepatocitos (Berry and Friend, 1969; Berry and Phillips, 2000). Asimismo, los estudios en hígado y capilares pulmonares de mamíferos han sido atractivos ya que con ellos se ha podido entender los efectos

de diferentes citocinas y fármacos sobre las diferentes funciones hepáticas y pulmonares bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Mehvar *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 1994; Liao *et al.*, 1995a; 1995b; Wagner *et al.*, 1999; Mehvar and Zhang, 2002). De hecho el cultivo de células endoteliales derivadas de la vena umbilical humana se basa en una perfusión incipiente de la vena umbilical (Jaffe *et al.*, 1973).

Los sistemas de perfusión permiten analizar la fisiología de un órgano en ausencia de los sistemas de integración sistémica tanto endocrina como nerviosa, y sirven como modelos intermedios entre los estudios con cultivos y preparaciones *in vitro* y, aquellos en los que se emplean modelos experimentales con animales íntegros. Desde esta perspectiva su uso arroja información que permite sustentar mejor las extrapolaciones que se hacen desde los sistemas de cultivo *in vitro* a lo que ocurre en un organismo completo.

## JUSTIFICACIÓN

Las metástasis son la principal complicación asociada con desordenes malignos en humanos y se asocian a la creciente morbi-mortalidad de las enfermedades oncológicas. Se ha demostrado recientemente, que las metástasis se pueden originar a partir del crecimiento intravascular de células tumorales adheridas al endotelio, incluso sin necesidad de la extravasación de las células tumorales (Al-Madhi *et al.*, 2000), resaltando la importancia de las interacciones entre células tumorales y células endoteliales en la metástasis tumoral. Por lo tanto, un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares que regulan estas complejas interacciones permitirá establecer y desarrollar mejores terapias para limitar y/o prevenir la evolución de focos de crecimiento metastásicos. Muchos aspectos importantes referentes a la adhesión de células tumorales con el endotelio vascular han sido revelados *in vitro*, usando ensayos de adhesión estáticos y técnicas de cámaras de flujo, o *in vivo*, empleando animales inmunodeficientes o singénicos y microscopia intravital. Sin embargo, estas aproximaciones son insuficientes para estudiar el papel de diferentes moléculas de adhesión en distintos estados de la cascada metastásica en el contexto del tejido blanco bajo condiciones patofisiológicas.

Los cultivos de células endoteliales derivadas de la vena umbilical humana han sido un buen sistema de estudio de las funciones del endotelio desde que fue desarrollado por Jaffe *et al.* (1973). Partiendo de la gran cantidad de información que existe con este modelo y con el propósito de desarrollar un sistema de vena humana perfundida *ex vivo*, nos propusimos establecer una preparación de vena umbilical humana perfundida. El desarrollo de un modelo endotelial de esta naturaleza permite mantener un microambiente original y un flujo hemodinámico que puede aplicarse al estudio de los procesos celulares y moleculares relevantes para la adhesión y la invasión metastásica.

## HIPÓTESIS

Las complejas interacciones célula tumoral-endotelio durante la metástasis hematológica podrán ser observadas y estudiadas en un contexto más cercano al fisiológico, empleando un modelo *ex vivo* de vena umbilical humana perfundida que retenga viabilidad y capacidad funcional.

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer un modelo de perfusión *ex vivo* de la vena umbilical humana que permita estudiar las interacciones de las células tumorales humanas U937 con el endotelio vascular.

## **OBJETIVO PARTICULARES**

- i. Diseño de cámaras para el mantenimiento, del medio de perfusión y de la vena umbilical.
- ii. Mantener la preparación bajo condiciones de perfusión en las cuales no se dañe la monocapa endotelial.
- iii. Evaluar la viabilidad y arquitectura endotelial por tinciones vitales, ensayos enzimáticos, inmunofluorescencia indirecta, tinción H-E, y microscopía electrónica de barrido.
- iv. Valorar la capacidad de producción de óxido nítrico del endotelio perfundido a estímulos fisiológicos, tales como TNF- $\alpha$ .
- v. Perfundir a través de la vena umbilical TNF- $\alpha$ , y posteriormente observar la adhesión de células tumorales U937 al endotelio vascular perfundido mediante:
  - Tinciones de H-E en cortes en criostato.
  - Fluorocromos vitales, tiñendo las células tumorales y/o endoteliales vivas.
  - Inmunofluorescencia contra antígenos específicos de endotelio y de células tumorales en cortes en criostato.
  - Microscopía electrónica de barrido en muestras fijadas.
  - Microscopía electrónica de transmisión en muestras fijadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sistema de Perfusión

*Tubería.* Los tubos de alimentación que se emplearon durante las perfusiones no deberían permitir la adhesión de células ni la liberación de factores que pudieran activar al endotelio vascular. Por ello, se emplearon tubos MasterFlex Pharmed de 3 mm de diámetro (no. 6408-02, Cole-Parmer Instrument Company, Chicago, IL) para el sistema de recirculación, ya que han sido utilizados en sistemas *in vitro* donde se ha estudiado la adhesión de leucocitos al endotelio bajo condiciones de flujo (Jones *et al.*, 1996). Además, se empleó un equipo para venoclisis Plastiset<sup>®</sup> (Becton Dickinson, México) para el sistema de perfusión. Con este equipo se entregaba el medio de perfusión a la preparación.

*Canulas.* Se utilizaron sondas hembra de acero inoxidable estériles No. "00" de 1.5 mm de diámetro (B-D 14, Yale, Becton Dickinson, México) con punta roma para canular cada una de las preparaciones.

*Reservorios.* Los reservorios fueron hechos de vidrio (Imparlab, México), ya que comparado con otros materiales (por ejemplo, polipropileno, Teflón, o cerámica), tiene la ventaja de que la preparación y el medio de perfusión pueden ser observados a lo largo de todo el experimento. Además, fueron diseñados de doble fondo para mantener la temperatura y humedad relativa constantes.

Las dimensiones internas de la cámara de calentamiento del medio de perfusión y de la cámara donde se mantuvo la preparación fueron de 2.5 x 7.0 cm y 3.5 x 9.0 cm, respectivamente.

*Sistema de calentamiento y recirculación.* Para mantener la temperatura constante, se empleó un baño de agua modelo CB 8-30e (Heto Lab Equipment, Gydevana, Denmark), conectado a los reservorios de doble fondo por medio de tubos de latex de 6 mm de diámetro.

El sistema de recirculación fue mantenido constante por una bomba peristáltica MasterFlex 7015-20 (Cole-Parmer Instrument Company, Chicago, IL).

Para evitar la contaminación del sistema por endotoxina o cualquier otro agente bacteriano y/o micótico, la tubería y los reservorios fueron limpiados antes y después

de cada experimento con alcohol 70%, seguido por un lavado extenso con agua bi-distilada.

*Medio de perfusión.* Durante todos los experimentos de perfusión se empleo medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero de ternera (ST) (como agente oncótico) y antimicótico 1% (todos de Gibco BRL, Rockville, MD). El medio de perfusión fue continuamente oxigenado con una mezcla de 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub> a lo largo de todo el tiempo que duró el experimento para mantener el pH dentro de rango fisiológico (pH 7.2-7.4).

*Material biológico.* Se utilizaron fragmentos pequeños de vena (~5 cm) aislada de cordones umbilicales humanos procedentes de partos eutócicos y cesáreas de mujeres gestantes sin complicaciones ni procesos infecciosos o enfermedad agregada (por ejemplo, diabetes gestacional o preclampsia).

#### Obtención de Células

Células endoteliales primarias (HUVECs) fueron obtenidas de cordones umbilicales humanos procedentes de partos eutócicos y cesáreas de mujeres gestantes sin complicaciones ni procesos infecciosos o enfermedad agregada (por ejemplo, diabetes gestacional o preclampsia), de acuerdo al procedimiento descrito por Jaffe *et al.* (1973). Brevemente, la vena fue canulada y sometida a proteólisis enzimática con tripsina 0.1% (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) en verseno (NaCl 136 mM, KCl 5.35x10<sup>-3</sup> mM, EDTA 5.26x10<sup>-4</sup> mM, Tris 28 mM pH 7.7) durante 15 min a 37°C. La suspensión celular resultante fue colectada en tubos estériles y centrifugada a 280xg por 10 min. El sobrenadante se aspiró y la pastilla celular se sembró de acuerdo a las condiciones de cultivo.

La línea L929 y células promielocíticas humanas U937 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (Manassas, VA).

#### Condiciones de Cultivo Celular

HUVECs fueron mantenidas en medio de cultivo M199 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina (200 mM) (todos de Gibco BRL, Rockville, MD), heparina (0.1 mg/ml) (Sigma Chemical, St Louis, MO), mitógeno endotelial (0.1 mg/ml) (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA), mezcla de antibióticos

(penicilina 100 U/ml, y estreptomina 100 µg/ml) y antimicótico (anfotericina 0.25 µg/ml) (Gibco BRL, Rockville, MD). Para los experimentos, las células fueron utilizadas entre los pasajes 1 y 2, sembrándose a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Células promielocíticas humanas U937 fueron mantenidas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB y antimicótico 1% (todos de Gibco BRL, Rockville, MD). Para evitar su activación por endotoxina en todas las etapas de cultivo, sólo se empleo material de plástico nuevo (Costar).

La línea L929 fue mantenida en medio MEM suplementado con 5% de SFB (Gibco BRL, Rockville, MD) y 5% de suero de ternera (ST) (In vitro, México).

Todos los cultivos celulares fueron incubados a 37°C con una humedad relativa al 100% y 5% CO<sub>2</sub>.

#### Ensayo de Adhesión por Gravedad

Se usó el método descrito por McEvoy (1996) con algunas modificaciones. HUVECs crecieron en placas Costar de 48 pozos (1cm<sup>2</sup>/pozo) hasta alcanzar 100% de confluencia y formar una monocapa continua. Posteriormente, se estimularon con TNF- $\alpha$  (1ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN) durante 3 h. Paralelamente, células U937 fueron radiomarcadas con [<sup>3</sup>H]-timidina (NEN, Boston, MA), incubando  $2 \times 10^5$  células/ml con 1 µCi/ml durante 48 h. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron con PBS suplementado con CaCl<sub>2</sub> (0.9 mM) y MgCl<sub>2</sub> (0.4 mM) para eliminar la [<sup>3</sup>H]-timidina no incorporada antes de su adición a las HUVECs. 250 µl de la suspensión celular de U937 ( $2 \times 10^5$  células) fue adicionada a cada pozo que contenía HUVECs previamente tratadas con TNF- $\alpha$  o medio solo como control. Los dos tipos celulares fueron co-incubados por 3 h a 37°C. Después de la incubación, las células U937 no adheridas se removieron por aspiración y los pozos se lavaron dos veces con PBS suplementado con CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>. Inmediatamente después, las células adheridas se lisaron con 500 µl de NaOH 0.2 M y se incubaron toda la noche a 37°C bajo 100% de humedad. Los lisados se mezclaron con 3 ml de líquido de centelleo, y para valorar la cantidad de células U937 adheridas a las HUVECs se cuantificó la [<sup>3</sup>H]-timidina en un contador de emisiones  $\beta$  (LS6000SC, Beckman, Palo Alto, CA). Los resultados se

expresaron como porcentaje de células adheridas en relación al total de células adicionadas a cada pozo.

#### Ensayo de Adhesión con Rotor de Placas

Con el propósito de reducir al mínimo la duración del ensayo de adhesión acortamos los tiempos de estimulación con TNF- $\alpha$ , sedimentamos las células U937 por centrifugación y acortamos el tiempo de co-incubación.

Brevemente, HUVECs crecieron en placas Costar de 48 pozos hasta alcanzar 100% de confluencia y formar una monocapa continua. Posteriormente, se estimularon con TNF- $\alpha$  (1ng/ml) a diferentes tiempos. Paralelamente, células U937 fueron radiomarcadas con [ $^3$ H]-timidina como se describió en "ensayo de adhesión por gravedad". Inmediatamente después de adicionar células U937 ( $2 \times 10^5$ ) a cada pozo que contenía HUVECs previamente tratadas con TNF- $\alpha$  o medio solo como control, las células fueron sedimentadas por centrifugación a  $60 \times g$  por 5 min, empleando un rotor de columpio para placas (Labofuge 400, Heraeus Instruments, Postfach, Hanau). Los dos tipos celulares fueron co-incubados a diferentes tiempos. Para determinar el porcentaje de células U937 adheridas al endotelio, el resto del procedimiento fue realizado de manera idéntica al "ensayo de adhesión por gravedad".

#### Viscosidad y Densidad del Medio RPMI-1640

Con el propósito de definir el valor de la fuerza de rozamiento o "shear stress" y el régimen de flujo –laminar o turbulento– que ocurrían dentro de la vena umbilical durante los experimentos de perfusión, fue necesario conocer y determinar –previamente– los valores de la viscosidad  $\mu$  y densidad  $\rho$  del medio RPMI-1640 (+10% ST) con o sin células tumorales U937, para sustituirlos en la fórmula para flujos Newtonianos y en el Número de Reynolds, respectivamente.

*Viscosidad.* La viscosidad  $\mu$  del medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero de ternera a 37°C fue determinada a través de un Reometro (PSV002AB, Brookfield Engineering Laboratories, Inc). Como cualquier equipo, el Reometro –con el cual trabajamos– presentó un límite de resolución, que fue de 0.9 cP (centipoises), por lo

que no se pudieron medir viscosidades por debajo de este valor, ya que sería muy posible obtener mediciones erróneas. Debido a ello se trazó una curva de tendencia a diferentes temperaturas para aproximarse al valor real de la viscosidad del medio, ya que la viscosidad de cualquier fluido (Newtoniano o no-Newtoniano) es directamente proporcional a la temperatura.

Brevemente, se agregaron 30 ml de medio RPMI-1640 (+10% de ST) con o sin células tumorales U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml) en el interior del estator (0.26 mm de diámetro), el cual fue introducido en el Reometro, que a su vez estuvo conectado a una computadora personal. La velocidad angular se fijó en 1500 rpm, ya que para un fluido Newtoniano –como el agua– la viscosidad no depende de la velocidad. Se tomaron 10 lecturas durante 2 min cada 20 seg a diferentes temperaturas (8-30°C). Finalmente, los datos fueron capturados con el programa Rheovision32 v2.0, y analizados en Origin v7.0.

*Densidad.* La densidad  $\rho$  del medio RPMI con y sin suero de ternera fue determinada de la siguiente manera; se pesó 1 cm<sup>3</sup> de medio en una balanza analítica (Sauter GmbH D-7470, Albstadt 1-Ebingen) a temperatura ambiente por duplicado. Los datos fueron sustituidos en la ecuación  $\rho = m/v$ , y los resultados se expresaron en gramos por centímetro cúbico.

### **Viabilidad Celular**

Para evaluar la viabilidad e integridad estructural de la monocapa endotelial en la vena umbilical humana, antes y después de las sesiones de perfusión, se realizaron diferentes aproximaciones, a través del uso de colorantes vitales, ensayos enzimáticos, técnicas histológicas y de microscopía (electrónica y de fluorescencia).

### **Integridad Membranal por Lactato Deshidrogenasa**

Una de las maneras de poder establecer la viabilidad celular del endotelio vascular se realizó mediante la prueba para determinar la posible liberación de enzimas de escape, como la lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de perfusión. Esta enzima se localiza en el citoplasma de todas las células cuando su membrana se encuentra íntegra, sin embargo, si la membrana está alterada o dañada la enzima citosólica es liberada al medio, por lo que puede ser detectada.

La lactato deshidrogenasa, que es dependiente de  $\text{NAD}^+$ , cataliza la siguiente reacción:  $\text{piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{lactato} + \text{NAD}^+$ . Tanto el  $\text{NAD}^+$ , como el  $\text{NADH}$ , absorben alrededor de los 260 nm. Sin embargo, sólo el  $\text{NADH}$  presenta una banda de absorción característica centrada a 340 nm. Por tanto, es posible calcular la concentración de  $\text{NADH}$  consumido en todo momento. Si existen cantidades suficientes de LDH y  $\text{NADH}$ , se puede registrar la desaparición de  $\text{NADH}$  o, lo que es lo mismo, la variación de  $A_{340}$  en función del tiempo, como una medida de la cinética de la reacción.

*Preparación de las muestras.* Se evaluó la actividad de LDH en el medio de perfusión de venas umbilicales perfundidas con o sin  $\text{TNF-}\alpha$  durante 2 h, al cabo de las cuales se adicionaron células tumorales U937 durante 1 h más. Al término de cada uno de estos período de perfusión (2 y 1 h), el medio fue colectado, centrifugado y almacenado a  $-70^\circ\text{C}$ . También se perfundieron células U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml), en ausencia de vena umbilical, con el propósito de valorar su posible contribución a la actividad de LDH detectada en el líquido de perfusión. Además, se analizó la liberación de LDH en el medio de cultivo de células U937 y HUVECs –obtenidas de un fragmento de 5 cm del mismo cordón empleado en las perfusiones–, para comparar los porcentajes respecto a la liberada en el medio de perfusión. Como control positivo, se emplearon fibroblastos murinos de la línea L929-P6. Para obtener la concentración total de LDH, la vena, HUVECs, células L929 y U937 fueron lisadas con tritón 0.1% durante 5-10 min a  $37^\circ\text{C}$ .

*Análisis de la actividad de LDH.* Se empleo la prueba de actividad de LDH de acuerdo al método descrito por Berry *et al.* (1991). Brevemente, en esta técnica se preparan soluciones de  $\text{NADH}$  (0.24 mM) y piruvato (9.76 mM) en una solución amortiguadora de Tris-NaCl (81.3 mM-203.3 mM) pH 7.2. Para cada prueba se tomaron 833  $\mu\text{l}$  de Tris-NaCl-NADH y se adicionaron 16.7  $\mu\text{l}$  de la muestra de interés, se mezclaron y se determinó su  $A_{340}$  durante 2 min cada 15 seg en el lector DU 640 (Beckman, USA). Posteriormente, se adicionaron 170  $\mu\text{l}$  de Tris-NaCl-Piruvato para iniciar la reacción. La absorbancia se registró a lo largo del tiempo de igual manera.

De cada lectura de 2 min se calculó el cambio promedio. Se restó el cambio promedio con muestra sin piruvato del cambio promedio en presencia de piruvato. Este cambio

promedio normalizado se convirtió en porcentaje considerando el cambio promedio normalizado de lactato deshidrogenasa total como 100%. Los datos fueron capturados y analizados con el programa Microsoft® Excel XP.

#### **Ensayo de Viabilidad por Diacetato de Diclorofluoresceína**

Otra técnica que valora la funcionalidad de la membrana es la que utiliza yoduro de propidio y diacetato de diclorofluoresceína, bajo condiciones de microscopia de fluorescencia. Con esta técnica se visualizan las células funcionales en color verde frente a las células muertas que se observan de color rojo.

El diacetato de Diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA), es un componente no fluorescente estable que puede difundir hacia el interior de las células, donde sufre desesterificación por esterasas intracelulares. El componente resultante, diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF), es atrapado dentro de las células. H<sub>2</sub>DCF intracelular puede ser oxidado por hidropéroxidos orgánicos e inorgánicos para producir H<sub>2</sub>DCF fluorescente. Este reagente ha sido utilizado para visualizar cambios oxidativos en hígado de rata perfundido, y en el endotelio microvascular durante la activación de neutrófilos (Suematsu *et al.*, 1991, 1993; Royal and Ischiropoulos, 1993).

Brevemente, la vena fue perfundida con o sin TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) a diferentes tiempos. 15 min antes de finalizar cada experimento, se eliminó el medio de perfusión, e inmediatamente después, la preparación fue perfundida con medio de perfusión libre de suero adicionado con H<sub>2</sub>DCFDA 8  $\mu$ M (Molecular Probes) durante 15 min. A continuación, la preparación se lavo con el mismo medio sin H<sub>2</sub>DCFDA por 5 min para eliminar el colorante precursor. Finalmente, se disectó la vena de manera longitudinal y se observó bajo el microscopio de fluorescencia (MRC 1024, BioRad). Las células viables y funcionales fueron visualizadas con un citoplasma en color verde.

#### **Tinción con Ioduro de Propidio para la Exclusión de Células Muertas**

Para evaluar la localización de posibles alteraciones espaciales y temporales – ocasionadas por las condiciones de perfusión– en el endotelio vascular, se emplearon tinciones vitales. Una de las más comunes es la tinción con Ioduro de Propidio (IP). Este reagente es un fluorocromo que se intercala entre las bases del DNA

incrementando sensiblemente su fluorescencia cuando se excita a 480 nm. La membrana de células viables no permite su paso al interior del citoplasma, de manera que únicamente se teñirán células no viables que tengan alterada y/o dañada su membrana celular (células muertas) (Gore *et al.*, 1989; Sauch *et al.*, 1991; Suematsu *et al.*, 1991).

Brevemente, la vena fue perfundida con o sin TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) a diferentes tiempos. Al término de cada experimento, se adicionó yoduro de propidio (IP) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) al medio de perfusión a una concentración final de 0.5  $\mu$ M, y la preparación fue perfundida durante 60 seg. Posteriormente, se lavo el interior de la vena con el mismo medio sin IP, e inmediatamente después se disectó el tejido de manera longitudinal y se observó bajo condiciones de microscopia de fluorescencia (MRC 1024, BioRad). De manera paralela, se permeabilizaron venas umbilicales humanas no perfundidas con glutaraldehído 3%. Los posibles daños fueron identificados como "manchas" rojas que corresponden a núcleos celulares.

#### Cuantificación de Nitratos/Nitritos

El óxido nítrico (NO) reacciona con el medio de cultivo para producir nitratos/nitritos, cuya concentración puede ser tomada como una medida de la producción de NO. La concentración de nitratos/nitritos en el medio de perfusión y en el sobrenadante de células cultivadas fue determinada por un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Griess (Green *et al.*, 1982).

*Preparación de las muestras.* La toma de muestras se llevó a cabo de manera idéntica a la realizada en "Integridad membranal por lactato deshidrogenasa".

Todas las muestras fueron desproteinizadas antes de su análisis. Para un ml de muestra se adicionaron 250  $\mu$ l de ZnSO<sub>4</sub> 30%. Las muestras fueron mezcladas por vortex durante 30 seg y entonces centrifugadas a 10,000xg durante 10 min. 500  $\mu$ l de sobrenadante fueron colocados en tubos Eppendorf para su posterior reducción a nitritos.

*Activación de Cd.* Se usó el método descrito por Green *et al.* (1982). Para activar el cadmio, a una solución acuosa de CuSO<sub>4</sub> 5% se añadieron gránulos de Cd y fueron lavados durante 5 min. El exceso de Cu metálico fue removido con abundante agua destilada. Posteriormente, se lavo con HCl 0.1 N para solubilizar y remover el

$\text{Cd}(\text{OH})_2$ . Finalmente, los gránulos fueron lavados con abundante agua destilada, y almacenados en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5% a 4°C.

*Contenido de nitratos/nitritos.* Los nitratos de una muestra fueron reducidos a nitritos por Cd activado. Brevemente, 500  $\mu\text{l}$  de una muestra desproteinizada fueron incubados con 10 lentejas de Cd activado durante 60 min. 300  $\mu\text{l}$  de cada muestra reaccionaron con 1.5 ml del reagente de Griess para formar un color azo-púrpura. El color del producto se desarrolló a temperatura ambiente, y se determinó su  $A_{546}$  en el lector DU 640 (Beckman, USA).

El reagente de Griess consistió de una parte de N-N-Naftiletildiamina-HCl 0.1% en  $\text{H}_2\text{O}$  más una parte de sulfanilamida 1% en  $\text{H}_3\text{PO}_4$  5%; las dos partes fueron mezcladas por vortex y mantenidas en hielo durante su utilización.

*Curva estándar.* Se obtuvo la curva tipo de nitratos/nitritos empleando  $\text{KNO}_3$  como estándar. Las muestras problema (diluidas 1:4) fueron analizadas por duplicado. Los resultados se corrigieron de acuerdo a la cantidad de nitratos presentes en el medio de perfusión RPMI-1640. Por regresión con mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de la curva tipo con la que se calculó la concentración de nitratos/nitritos de las muestras problema empleando el programa Origin v7.0.

#### Tinción de Células U937 con PKH26

La tinción de células U937 con el colorante PKH26 se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Kit PKH26-GL, Sigma Chemical Co, St Louis, MO). Brevemente,  $1 \times 10^6$  células U937 se lavaron con solución salina libre de pirógenos. Las células se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de diluyente C y, posteriormente, se adicionaron en 200  $\mu\text{l}$  de una solución stock previamente preparada (0.1  $\mu\text{l}$  de colorante PKH26 en 400  $\mu\text{l}$  de diluyente C). Las células se mantuvieron en agitación suave a temperatura ambiente durante 2 min en ausencia de luz. Posteriormente, se adicionó un ml de medio RPMI-1640 completo para detener la reacción. Finalmente, las células se lavaron y sembraron de acuerdo a las condiciones de cultivo. La emisión de fluorescencia roja fue evaluada en el microscopio de fluorescencia (MRC 1024, BioRad).

### Microscopia Electrónica de Barrido

Al término de cada perfusión, la vena y células U937 fueron fijadas toda la noche con glutaraldehído 3% en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1M) a 4°C. Las muestras se lavaron con el mismo amortiguador, y se post-fijaron en una solución de tetróxido de osmio 1% durante 2 h a 4°C. Posteriormente, todas las muestras fueron deshidratadas secuencialmente en una serie de alcoholes graduados (30-100%) durante 15 min en cada paso, y entonces secadas al punto crítico en  $\text{CO}_2$  a una temperatura de 40-42°C y una presión de 1400 psi, sombreadas con oro, y finalmente analizadas en el microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5410LV en la Unidad de Microscopía del IFC.

### Microscopia Electrónica de Transmisión

Al término de cada perfusión, la vena y células U937 fueron fijadas con glutaraldehído 3% en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 durante 2 h a 4°C. Las muestras se lavaron con el mismo amortiguador, se post-fijaron por 2 h en tetróxido de osmio 1% a 4°C, y posteriormente, fueron deshidratadas en una serie de alcoholes graduados. A continuación, se colocaron en óxido de propileno y después en resina spi-pon 812 (v/v, en agua destilada) durante 48 h a temperatura ambiente. Las muestras fijadas fueron incluidas en resina spi-pon 812 que se dejó polimerizar durante 48 h a 60°C. Finalmente fueron cortadas en secciones de 60 nm de espesor y analizadas en el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1200Ex II en la Unidad de Microscopía del IFC.

### Preparación de Laminillas

Se utilizaron laminillas esmeriladas de 2.5 x 7.5 cm (Corning, México) tratadas con poly-L-lisina y gelatina, para Inmunohistoquímica y Hematoxilina-Eosina, respectivamente.

*Poly-L-lisina.* Las laminillas fueron sumergidas en alcohol absoluto durante 20 min, y lavadas en abundante agua destilada. Este procedimiento se repitió un par de veces. Posteriormente, las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente, y se sumergieron en una solución fresca de poly-L-lisina 0.01% (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) por 15 min. Finalmente, se secaron a 60°C durante 60 min.

*Gelatina.* Laminillas lavadas en alcohol absoluto –como se mencionó previamente– fueron sumergidas en una solución de gelatina 1% (BD Bioxon, Becton Dickinson, México) por 20 min. Finalmente, se dejaron secar a 60°C durante 60 min.

#### **Inclusión del Tejido**

Al término de cada ensayo de perfusión, se introdujo ~1 ml de Tissue-Tek® (Sakura Finetechnical Co, USA) en el interior de la vena umbilical, la cual fue colocada inmediatamente en isopentano (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ), previamente enfriado en nitrógeno líquido. Las muestras fueron almacenadas a -70°C.

#### **Técnica Histológica Hematoxilina-Eosina**

Para detectar la firme adhesión de células tumorales U937 al endotelio vascular se realizaron cortes histológicos (20 µm) de cada preparación en el criotomo (Jung Frigocut 2800E, Leica) a -20°C. Las muestras se lavaron en agua destilada, se tiñeron en Hematoxilina de Hills durante 5 min, y posteriormente se lavaron nuevamente en agua destilada. El viraje de color se realizó con Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> durante 90 seg, seguido por un lavado extenso en agua destilada. A continuación, las muestras se tiñeron con Eosina durante 30 seg, y posteriormente, fueron deshidratadas en una serie de alcoholes graduados (96-100%) y xilol, y finalmente, se añadieron 5 µl de medio de montaje a cada tejido. Las muestras fueron analizadas en el microscopio de luz Nikon TMS.

#### **Inmunofluorescencia indirecta**

Se realizaron cortes de 8-10 µm de cada muestra a -20°C. Todos los cortes se permeabilizaron con tritón X-100 0.3% en PBS durante 3 min. El bloqueo de los sitios reactivos se realizó con BSA 5% (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) a temperatura ambiente durante 60 min. Posteriormente, se adicionaron 300 µl del primer anticuerpo diluido en PBS (1:200 para anti-factor von Willebrand (Dakopatts, Denmark), anti-β sarcoglicano (Novocastra), y anti-integrina beta-1 (Santa Cruz)), y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente. A continuación, las laminillas se lavaron 3 veces con PBS, y después, se adicionaron 300 µl del segundo anticuerpo

acoplado a FITC o rodamina (anti-ratón) diluido en PBS (1:200), y se incubó durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavo 3 veces con PBS, y finalmente se añadieron 5  $\mu$ l de medio de montaje Vectashield® con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; tiñe núcleos de color azul) (Vector, Burlingame, CA) a cada tejido. Las muestras fueron analizadas en el microscopio de fluorescencia (MRC 1024, BioRad), y almacenadas a -70°C.

#### **Análisis Estadístico**

El análisis de significancia estadística entre los distintos grupos experimentales se determinó con un Análisis de Varianza (ANOVA) ( $P < 0.05$ ), seguido por una comparación múltiple de medias (Prueba de Tukey y Prueba de Scheffe') ( $P < 0.05$ ), utilizando el programa Origin v7.0.

## RESULTADOS

### SISTEMA DE PERFUSIÓN

En este trabajo describimos un nuevo sistema de perfusión *ex vivo* de vena umbilical humana, el cual podrá servir como un modelo experimental para observar y estudiar las complejas interacciones entre células tumorales y el endotelio vascular durante el proceso de metástasis tumoral en un contexto más cercano al fisiológico.

#### a) Preparación de las muestras

Dado que el objetivo principal de esta tesis fue la de desarrollar el sistema de vena umbilical humana perfundida *ex vivo*, iniciaremos esta sección por presentar brevemente las condiciones que encontramos como las mejores para mantener esta preparación funcional *ex vivo*. La vena fue aislada a partir de cordones umbilicales humanos, obtenidos de mujeres gestantes sin complicaciones ni procesos infecciosos o enfermedades agregadas (por ejemplo, diabetes gestacional o preeclampsia). La vena umbilical fue dividida en dos segmentos, que sirvieron como: (i) control y, (ii) experimental. Cada segmento fue cuidadosamente lavado con medio de perfusión libre de suero (como se describe en "Materiales y Métodos") para remover coágulos y restos sanguíneos. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, y los dos segmentos del mismo cordón umbilical fueron perfundidos bajo condiciones similares, excepto que una de las venas (experimental) fue perfundida con TNF- $\alpha$ , mientras que su compañera (control) únicamente con medio de perfusión. En todos los ensayos, se perfundió en dirección anterograda del extremo placentar hacia el fetal, es decir, en la misma dirección que ocurre *in vivo*.

#### b) Descripción del sistema

Cada segmento perfundido tuvo una longitud promedio de 5 cm de largo. El extremo placentar de la vena fue canulado con una sonda metálica No. "00" con punta roma para evitar el desgarramiento del interior, la cual se sujetó con unas pinzas porta-agujas (Fig. 5). La sonda se conectó a su vez a un sistema de

perfusión, empleando como reservorio una cámara de doble fondo para mantener la temperatura y humedad relativa constantes. Este reservorio –que contenía 10 ml



Figura 5 | Vena umbilical canulada con una sonda metálica No. "00".

el medio de perfusión- fue denominado "reservorio alto", y se ubicó a 55 cm de la base (Fig. 6A). La vena estuvo contenida en una cámara o reservorio "bajo" localizado a 15 cm de la base (Fig. 6B). A través un equipo para venoclisis Plastiset® se entregaba el medio de perfusión a la preparación. El líquido de perfusión que salía por el extremo fetal de la vena ("perfusado") se re-circuló llevándolo de regreso a la cámara alta por medio de una bomba peristáltica, cerrando así un

sistema de recirculación (Fig. 6C). El flujo dinámico a través de la vena fue generado como resultado de la diferencia de altura entre los dos reservorios (~30 cm), y el flujo se reguló por medio de la carretilla del mismo equipo de venoclisis (Fig. 6).

Durante los experimentos, el líquido de perfusión y la vena umbilical fueron mantenidos a 37°C, re-circulando agua de un baño de temperatura regulable conectado a los reservorios de doble fondo. El medio de perfusión se mantuvo equilibrado con una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> para mantener oxigenación adecuada y un pH dentro de rango fisiológico (pH 7.2-7.4). Para disminuir la pérdida de calor y O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>, así como para evitar la deshidratación del tejido, ambos reservorios fueron cubiertos con una membrana plástica.

La velocidad de flujo (Q) varió entre  $900 \pm 100 \mu\text{l}/\text{min}$  (condiciones fisiológicas que se presentan en venulas humanas de 1 mm de diámetro). La fuerza de rozamiento o "shear stress" se calculó usando la ecuación para flujos Newtonianos:  $\tau = 6\mu Q/h^2 w = (6\mu/h^2 w) Q$ , donde:  $\tau$  es la fuerza de rozamiento o "shear stress" (dinas/cm<sup>2</sup>);  $\mu$ , el coeficiente de viscosidad del fluido;  $h$ , la altura de la vena;  $w$ , el ancho de la vena; y  $Q$ , la velocidad de flujo (Vogel, 1996). El régimen de flujo – laminar o turbulento- se determinó empleando el número de Reynolds:  $N_r = \rho Dv/\mu$ , donde:  $\rho$  es la densidad;  $v$ , su velocidad media;  $\mu$ , el coeficiente viscosidad del fluido; y  $D$ , el diámetro de la vena (Vogel, 1996).

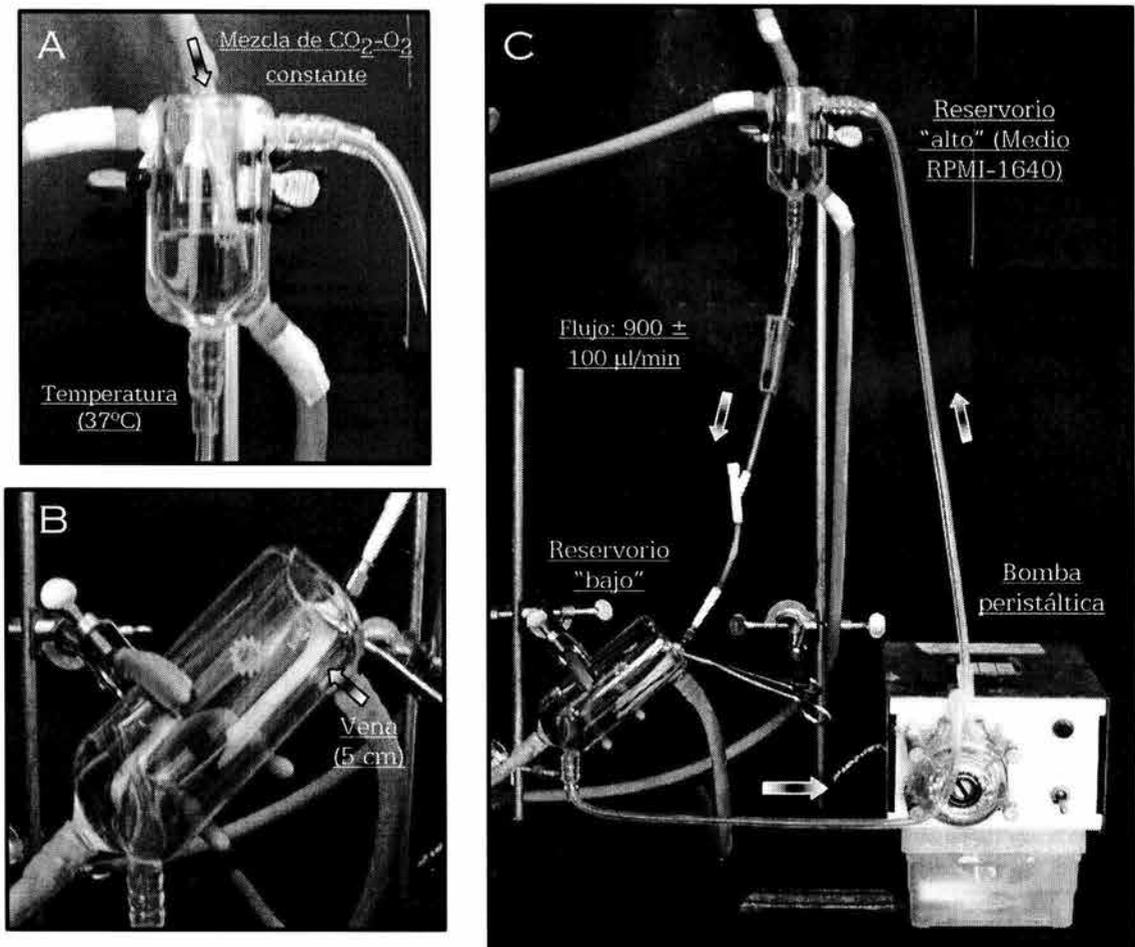


Figura 6 | Imagen representativa de los principales componentes del sistema de perfusión. A) Reservorio con medio RPMI-1640 burbujeado constantemente con una mezcla de 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ . B) Vena umbilical (5 cm de longitud) contenida en el reservorio "bajo". C) Sistema de recirculación. Se muestra la bomba peristáltica y, los reservorios "alto" y "bajo", con medio de perfusión y vena umbilical, respectivamente. Las flechas indican la dirección del flujo. La temperatura fue mantenida a  $37^\circ\text{C}$  recirculando agua a través de las camisas con una bomba y un baño de agua de temperatura regulable (no mostrado).

### c) Experimentos de flujo

La vena umbilical fue perfundida con o sin  $\text{TNF-}\alpha$  (1 ng/ml) durante 2 h, al cabo de las cuales se adicionaron células tumorales humanas U937 (a una densidad de  $3 \times 10^6$  células/ml) durante 1 h. Los experimentos fueron realizados, en ausencia y presencia de células, con una  $\tau = 1.8 \pm 0.2$  y  $\tau = 2.2 \pm 0.2$  dinas/ $\text{cm}^2$ , respectivamente. El número de Reynolds ( $N_R \leq 2000$ ) indicó que el régimen de flujo, que se presenta en el interior de la vena umbilical –tanto en ausencia como

en presencia de células-, se comporta como un flujo laminar. En todos los experimentos se utilizó medio de cultivo RPMI-1640 como medio de perfusión. Después del período de estimulación (con TNF- $\alpha$ ), seguido de la perfusión con células tumorales U937, el medio fue colectado y la vena fue incluida a -70°C usando medio O.C.T (Tissue-Tek<sup>®</sup>), o fijada en glutaraldehído 3%, para estudios de microscopía óptica, electrónica e inmunofluorescencia.

### MEDIO RPMI-1640 COMO SOLUCIÓN DE PERFUSIÓN

Con el propósito de definir que medio de cultivo emplear durante las perfusiones de la vena umbilical humana, se realizó una búsqueda bibliográfica de los principales medios que se utilizan en diferentes preparaciones perfundidas. En la mayoría de las perfusiones –hepáticas, cerebrales, cardíacas y de la glándula adrenal- se emplean soluciones salinas, tales como la solución salina “Krebs-Ringer” (Mortimore, 1961; Papaikononou, 1977; Sibley and Whitehosue, 1979; Döring and Dehnert, 1988; Mehvar and Zhang, 2002), o la solución de “Hanks” (Berry and Friend, 1969). Cabe mencionar que en modelos de cámara de flujo *in vitro*, en los cuales se perfunden células endoteliales (HUVECs) que fueron cultivadas *in vitro*, se emplean medios de cultivo M199 (Giavazzi *et al.*, 1993), DMEM/F12 (Haier *et al.*, 1999), o RPMI-1640 (Rinker *et al.*, 2001). Debido a la diversidad de medios empleados en las diferentes preparaciones y dado que nuestro propósito era evaluar la adhesión de células, se realizaron ensayos de adhesión *in vitro* con cinco diferentes medios de cultivo (M199, RPMI-1640, MEM, DMEM y Krebs-Ringer), para definir si los diferentes medios afectan la adhesión célula tumoral-endotelio bajo condiciones estáticas *in vitro* (ver “Ensayo de Adhesión por Gravedad” en “Materiales y Métodos”).

Como muestra la figura 7, la adhesión entre células tumorales y células endoteliales no se ve afectada por el uso de los diferentes medios de cultivo, sin embargo, al comparar las respuestas entre ellos –por un análisis de varianza (ANOVA)- se observaron ligeras diferencias. Normalmente, los ensayos de adhesión *in vitro* que se realizan en nuestro laboratorio se realizan en presencia de medio M199 (medio de crecimiento de HUVECs), y el porcentaje de células tumorales adheridas al endotelio activado por TNF- $\alpha$  oscila entre 40-60%. En los

ensayos que se describen en la figura 7, los porcentajes de adhesión fueron similares (~45%) a los que se obtienen con medio M199.

De todos los medios empleados, la adhesión con el medio MEM fue la que presentó mayor variación –reflejada en su desviación estándar (SD)- con respecto a los demás, quizá por que este medio de cultivo contiene la menor cantidad de componentes respecto a los demás.

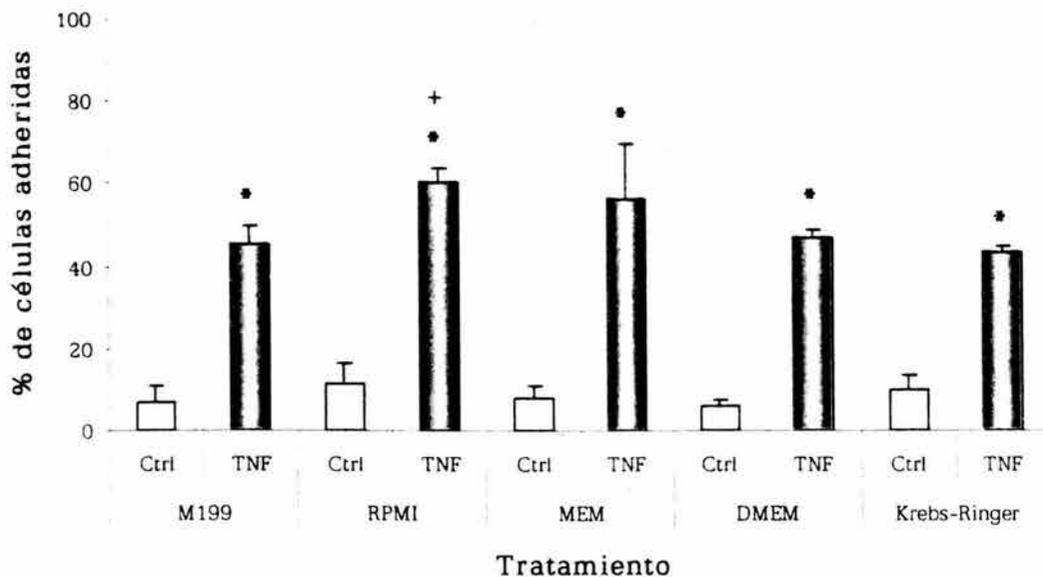


Figura 7 | La adhesión heterotípica célula tumoral-endotelio no se afecta por el uso de diferentes medios de cultivo. HUVECs fueron pre-tratadas con o sin TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) por 3 h, para posteriormente estar en contacto con células U937 durante 3 h más. Los ensayos de adhesión se realizaron en presencia de los medios de cultivo indicados. El \* indica diferencias significativas respecto a su propio grupo control ( $P < 0.05$ ), y + indica diferencias significativas respecto a M199, DMEM y Krebs-Ringer ( $P < 0.05$ ). Se indican los promedios  $\pm$  SD de al menos 4 experimentos independientes.

Si bien con el medio DMEM y la solución salina Krebs-Ringer, se obtuvieron porcentajes de adhesión similares a los del medio M199 (~40%) con respecto a su propio control, estos fueron significativamente menores con respecto al medio RPMI-1640 ( $P < 0.05$ ). Decidimos que es más conveniente emplear un medio de cultivo que una solución salina, ya que esta carece de aminoácidos y vitaminas que pudieran ser relevantes para la viabilidad y funcionalidad de las células endoteliales y por tanto para el proceso de adhesión *in vivo*. De los otros medios se escogió RPMI-1640, entre otras cosas, porque fue el que presentó el mayor

porcentaje de adhesión (~60%), una variación menor al 6% y, además, porque las células U937 –que fueron empleadas en las perfusiones de la vena umbilical-, crecen en este medio. Asimismo, ya que todas las células hematopoiéticas también se cultivan en este medio, el sistema podría servir para estudios de adhesión de leucocitos, para montar un modelo de inflamación.

### VELOCIDAD DE FLUJO

El flujo y la velocidad sanguínea en la vena umbilical humana obtenida por experimentos que se basan en el efecto Doppler es de  $126.0 \pm 23.4$  ml/min/kg y de  $9.0 \pm 3.6$  cm/s, respectivamente (Rasmussen, 1987; Di Naro *et al.*, 2001). Este flujo y velocidad son enormes y posiblemente no permitirían que se llevara a cabo el proceso de adhesión entre las células tumorales U937 y el endotelio vascular. Recientes observaciones apoyan esta noción (Glinskii *et al.*, 2003), ya que indican que si las células tumorales se desplazan a altas velocidades ( $\sim 16 \times 10^3$   $\mu\text{m/s}$ ) existe un número muy bajo de células que puedan interactuar con el endotelio, mientras que las células que se mueven lentamente ( $\leq 2 \times 10^3$   $\mu\text{m/s}$ ) podrán interactuar y llevar a cabo el proceso de “rolling” necesarios para la firme adhesión.

Brenner *et al.* (1995), desarrollaron una vena artificial donde estudiaron la adhesión entre células tumorales y endoteliales, para lo cual emplearon presiones fisiológicas de 16 mbar, velocidades de flujo de 15  $\mu\text{l/s}$  (equivalentes a 900  $\mu\text{l/min}$ ) y valores de la fuerza de rozamiento o “wall shear stress” de 2 dinas/cm<sup>2</sup>. Estos parámetros son condiciones físicas que ocurren en venulas de 1 mm de diámetro. Debido a lo anterior, se decidió emplear las velocidades de flujo que ocurren en venulas humanas para tratar de imitar las condiciones fisiológicas en las cuales pudiera ocurrir la adhesión célula tumoral-endotelio *in vivo*.

### VISCOSIDAD Y DENSIDAD DEL MEDIO RPMI-1640

Con el propósito de definir el valor de la fuerza de rozamiento o “shear stress” y el régimen de flujo –laminar o turbulento- que ocurrían dentro de la vena umbilical durante los experimentos de perfusión, fue necesario conocer y determinar –previamente- los valores de la viscosidad  $\mu$  y densidad  $\rho$  del medio RPMI-1640

(+10% ST) con o sin células tumorales U937, para sustituirlos en la fórmula para flujos Newtonianos y en el Número de Reynolds, respectivamente. Cabe mencionar que el término de "estrés de rozamiento" que resulta de la traducción del término en inglés "shear stress", desde el punto de vista físico está equivocado (Young, 1805).

### Viscosidad

La mayoría de los estudios donde se reportan valores de la fuerza de rozamiento o "shear stress", asumen que la viscosidad del medio es igual a la viscosidad del agua a 37°C (~0.7 centipoises, cP), sin realizar ningún tipo de medición (Haier, *et al.* 1999). Para eliminar cualquier tipo de error en la estimación de los valores de la fuerza de rozamiento o "shear stress", y dada la accesibilidad a un instrumento que permite determinarla –por medio de un reómetro–, se evaluó la viscosidad del medio RPMI-1640 (+10% ST) con y sin células U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml), a diferentes temperaturas, ya que la viscosidad de cualquier fluido (Newtoniano o no Newtoniano) es inversamente proporcional a la temperatura. El límite de detección del reómetro empleado fue de 0.9 cP, por lo que no se pudieron medir viscosidades por debajo de este valor. Debido a ello se trazó una curva de tendencia para aproximarse al valor real de la viscosidad del medio a 37°C. Los valores obtenidos y extrapolados por regresión exponencial –en ausencia de células– se muestran en la tabla 1 y figura 8.

Como se puede observar, el coeficiente de viscosidad del medio RPMI-1640 varió con la temperatura, disminuyendo a medida que la temperatura aumentaba. Al realizar la extrapolación de los datos para 37°C, los valores de la viscosidad del medio RPMI-1640 (en ausencia de células U937) fueron de 0.74 cP.

Estos resultados sugieren que el medio RPMI-1640 es ligeramente más viscoso que el H<sub>2</sub>O. Este pequeño, pero significativo incremento, puede deberse a los componentes del medio, tales como suero, sales y glucosa, principalmente.

Temperatura (°C)	Viscosidad $\mu$ (cP)
8 <sup>+</sup>	1.7±0.1
10 <sup>+</sup>	1.8±0.1
14 <sup>+</sup>	1.7±0.1
22 <sup>+</sup>	1.4±0.1
26 <sup>+</sup>	1.2±0.1
30 <sup>+</sup>	1.0±0.1
35 (H <sub>2</sub> O)	0.72-0.74
35 <sup>**</sup>	0.82
37 <sup>**</sup>	0.74

Tabla 1 | Valores obtenidos (+) y extrapolados (\*\*) de la viscosidad del medio RPMI-1640, en ausencia de células, a diferentes temperaturas. Se indican los promedios de 10 lecturas de 3 experimentos independientes.

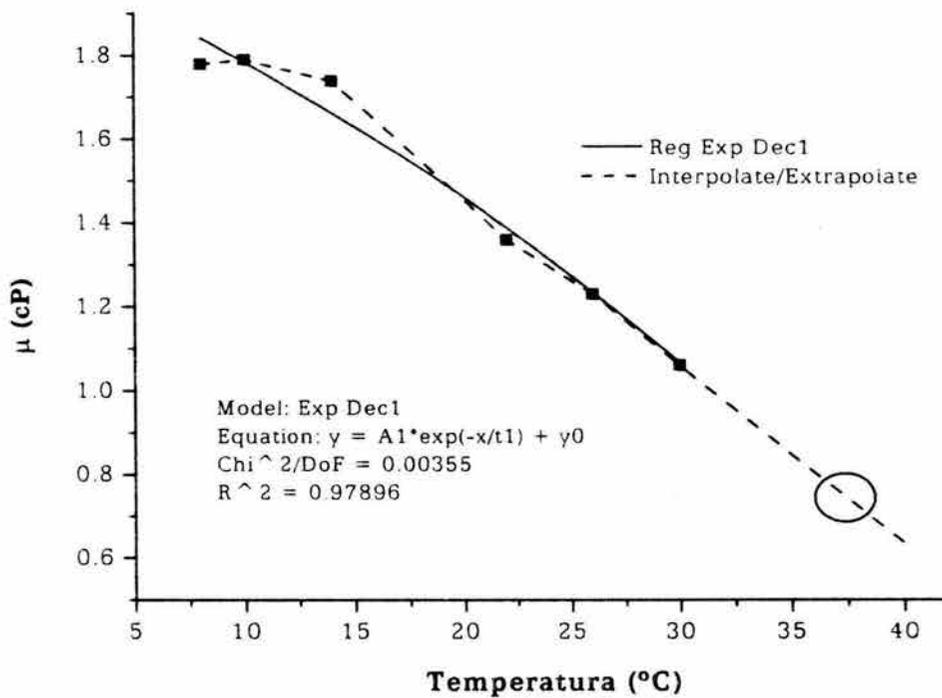


Figura 8 | Regresión exponencial de primer orden de la viscosidad del medio RPMI-1640, en ausencia de células, a diferentes temperaturas. La línea continua indica la regresión exponencial, mientras que la línea punteada indica los datos inter- y extrapolados. El círculo indica la ubicación del valor relevante en nuestro sistema. El inserto inferior indica la ecuación y el tipo de modelo utilizado en la regresión.

Posteriormente, se determinó la viscosidad del medio RPMI-1640 en presencia de células ( $3 \times 10^6$  células/ml). Los valores obtenidos y extrapolados por regresión exponencial empleando el programa descrito en "Materiales y Métodos", se muestran en la tabla 2 y figura 9.

Temperatura (°C)	Viscosidad $\mu$ (cP)
9.3 <sup>+</sup>	1.6 $\pm$ 0.04
13.3 <sup>+</sup>	1.3 $\pm$ 0.1
17.1 <sup>+</sup>	1.2 $\pm$ 0.1
24.7 <sup>+</sup>	1.1 $\pm$ 0.1
28.5 <sup>+</sup>	1.0 $\pm$ 0.1
35 (H <sub>2</sub> O)	0.72-0.74
35 <sup>**</sup>	0.92
37 <sup>**</sup>	0.9

Tabla 2 | Valores obtenidos (+) y extrapolados (\*\*) de la viscosidad del medio RPMI-1640, en presencia de células ( $3 \times 10^6$  células/ml), a diferentes temperaturas. Se indican los promedios de 10 lecturas de 3 experimentos independientes.

La viscosidad del medio, en presencia de células, varió igualmente con la temperatura, disminuyendo a medida que está aumentaba. Sin embargo, los resultados indican claras diferencias en el comportamiento de la viscosidad del medio RPMI en presencia ( $3 \times 10^6$  células/ml) o ausencia de células.

En presencia de células, la viscosidad (0.903 cP) se incrementó en un 21.2% con respecto al medio RPMI-1640 que no contenía células (0.745 cP). Esto puede ser de gran importancia, ya que se vería reflejado directamente en los valores de la fuerza de rozamiento, y en el régimen de flujo definido por número de Reynolds como laminar o turbulento. Hay que tener en cuenta que, la fuerza de rozamiento o "shear stress" será mayor mientras más viscosa sea la sustancia, y más rápido se desplace el flujo. Es decir, la magnitud de la fuerza de rozamiento es directamente proporcional al flujo y a la viscosidad.

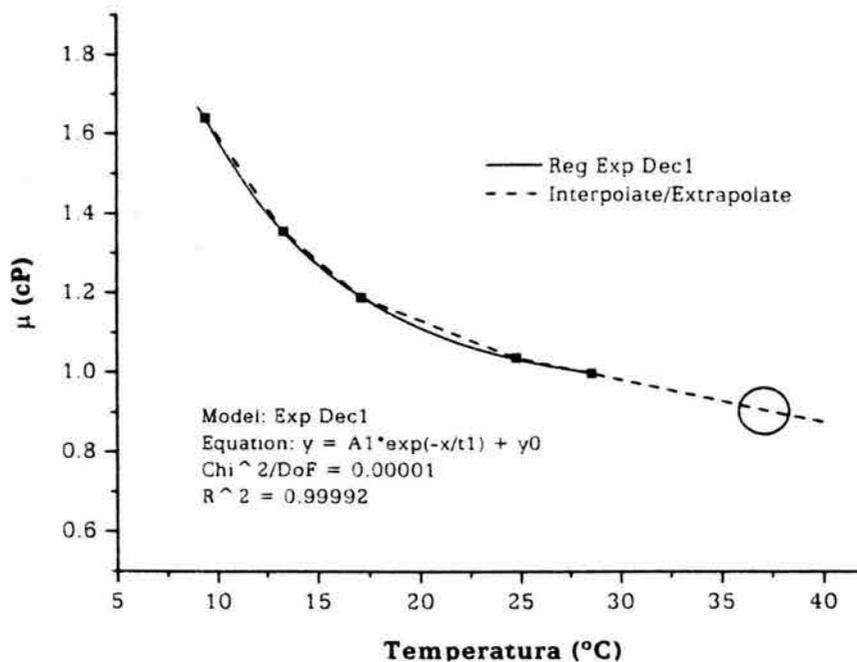


Figura 9 | Regresión exponencial de primer orden de la viscosidad del medio RPMI-1640, en presencia de células ( $3 \times 10^6$  células/ml), a diferentes temperaturas. La línea continua indica la regresión exponencial, mientras que la línea punteada indica los datos inter- y extrapolados. El círculo indica la ubicación del valor relevante en nuestro sistema. El inserto inferior indica la ecuación y el tipo de modelo utilizado en la regresión.

## Densidad

Como ya hemos dicho, el número de Reynolds proporciona información acerca del régimen de un fluido viscoso –laminar o turbulento– que se presenta en el interior de estructuras cilíndricas; por ello fue necesario determinar los valores de la densidad  $\rho$  del medio RPMI-1640 para sustituirlo en la fórmula:  $N_r = \rho Dv/\mu$  (Sears and Zemansky, 1979). Para ello se determinó el peso de  $1 \text{ cm}^3$  de medio RPMI-1640 a temperatura ambiente, y los datos fueron sustituidos en la relación  $\rho = m/v$  (la densidad de un material homogéneo se define como su masa por unidad de volumen). Los resultados se expresaron en gramos por centímetro cúbico.

Fluido	g/cm <sup>3</sup>
H <sub>2</sub> O	1.00
RPMI-1640	1.01 ± 0.01
RPMI-1640 suplementado con 10% ST	1.012 ± 0.01

Tabla 3 | Densidad del medio RPMI-1640 con y sin 10% de suero de ternera. Se indican los promedios ± SD de 3 mediciones independientes

Al realizar las mediciones con y sin suero de ternera, los valores de la densidad del medio RPMI-1640 fueron de 1.012 y 1.01 g/cm<sup>3</sup>, respectivamente. Estos resultados sugieren que el medio RPMI-1640 es ligeramente más denso que el H<sub>2</sub>O, debido – quizás- a los componentes del mismo, tales como sales, glucosa y suero, principalmente.

#### FUERZA DE ROZAMIENTO (“SHEAR STRESS”)

Originalmente, las células endoteliales fueron consideradas como una barrera inerte; sin embargo, en la actualidad se reconoce que estas células tienen una participación activa en la regulación de un gran número de procesos fisiológicos y patológicos.

El flujo pulsátil de la sangre, a través de la red tubular del sistema circulatorio, genera fuerzas biomecánicas que actúan sobre los vasos sanguíneos para modular su función y estructura intrínseca. Estas fuerzas hemodinámicas, que incluyen presión hidrostática, tensión cíclica, y fuerza de rozamiento o “shear stress”, constituyen una categoría especial de estímulo biofísico, que puede evocar importantes respuestas biológicas en las células que componen la pared de los vasos sanguíneos. Debido al papel central que juegan las células endoteliales en la homeostasis de los vasos, las respuestas inducidas hemodinámicamente tienen efectos tanto fisiológicos como patológicos (Resnick and Gimbrone, 1995).

El endotelio vascular responde a dos fuerzas hemodinámicas importantes, la presión perpendicular transmural y el flujo sanguíneo (Malek and Izumo, 1994), que generan dos fenómenos tensores: (i) el estrés perpendicular biaxial y, (ii) la fuerza de rozamiento. En años recientes se ha puesto mucha atención a esta última fuerza, ya que puede modular diferentes aspectos de la estructura y función

endotelial. Al parecer algunos de estos efectos resultan de la regulación en la expresión de ciertos genes endoteliales (Resnick and Gimbrone, 1995). El rango fisiológico de la fuerza de rozamiento o "shear stress" varía desde valores cercanos a 0 hasta más de 30 dinas/cm<sup>2</sup>. Estudios *in vitro* han demostrado que si se varia la fuerza de rozamiento se obtienen diferentes respuestas endoteliales (Resnick and Gimbrone, 1995). Por todo lo anterior, al montar un sistema de perfusión de la vena umbilical humana, con el propósito de analizar las respuestas endoteliales en esta preparación, consideramos de importancia hacer un esfuerzo por determinar la magnitud de la fuerza de rozamiento o "shear stress" que se presenta en el interior de la vena umbilical en los experimentos de perfusión. Para esto se empleo la formula para flujos Newtonianos:  $\tau = 6\mu Q/h^2 w = (6\mu/h^2 w) Q$ , donde:

$\tau$  = la fuerza de rozamiento o "wall shear stress" (dinas/cm<sup>2</sup>)

$\mu$  = viscosidad dinámica del fluido (0.745 cP; 0.903 cP)

Q = velocidad de flujo (900±100 µl/min)

h = altura de la vena (1.3 mm)\*

w = ancho de la vena (1.3 mm)\*

\*: valores promedio obtenidos de 20 venas individuales

Al sustituir los valores de la viscosidad, velocidad de flujo, altura y ancho de la vena, se obtuvieron los siguientes valores para la fuerza de rozamiento o "shear stress".

Condición	Fuerza de rozamiento o "shear stress" (dinas/cm <sup>2</sup> )
Ausencia de células	1.8±0.2
Presencia de células	2.2±0.2

Tabla 4 | Valores de fuerza de rozamiento o "shear stress" en presencia o ausencia de células (3×10<sup>6</sup> células/ml) U937. Los valores fueron obtenidos empleando la formula para flujos Newtonianos:  $\tau = (6\mu/h^2 w) Q$ .

Como se indica en la tabla 4, en ausencia de células, la fuerza de rozamiento o "shear stress" tuvo un valor de 1.8 dinas/cm<sup>2</sup>; mientras que en su presencia, fue de 2.2 dinas/cm<sup>2</sup>. Estos valores son comparables a los encontrados en vénulas humanas de 1 mm de diámetro (2 dinas/cm<sup>2</sup>), y en vénulas post-capilares donde se propone que ocurre la interacción célula tumoral-endotelio (Ley *et al.*, 1991; Brenner *et al.*, 1995). Al realizar un análisis de varianza seguido por una comparación múltiple de medias (prueba de Tukey), se detectó que no existen diferencias significativas –en los valores de fuerza de rozamiento o "shear stress"– tanto en presencia como en ausencia de células (P<0.05). No obstante, esta pequeña diferencia, no significativa desde el punto de vista estadístico, podría tener repercusiones a nivel fisiológico, ya que la fuerza de rozamiento actúa sobre componentes celulares adherentes (Haier and Nicolson, 2001).

Por otro lado, estos valores de fuerza de rozamiento o "shear stress" difieren en función de la viscosidad del medio RPMI-1640. De manera que, la magnitud de la fuerza de rozamiento es directamente proporcional a la viscosidad.

### NÚMERO DE REYNOLDS

La experiencia indica que hay una combinación de cuatro factores que determinan cuándo el régimen de un fluido viscoso a través de un tubo es laminar o turbulento. Esta combinación se denomina número de Reynolds,  $N_R$ , y se define mediante la expresión:  $N_R = \rho Dv/\mu$ . El número de Reynolds es un número adimensional, y, por tanto, su valor numérico es el mismo en cualquier sistema coherente de unidades. Cuando el número de Reynolds se encuentra entre 0 y 2000 el régimen de un fluido viscoso es laminar, mientras que por encima de 3000 el régimen es turbulento. Entre 2000 y 3000 hay una zona de transición en la cual el régimen es inestable y puede pasar de un tipo a otro (Vogel, 1996).

Por otro lado, estudios *in vitro* indican que dependiendo del régimen de flujo se pueden modular diferentes aspectos de la función endotelial. Por ejemplo, la aplicación de un flujo "laminar" a células endoteliales tiende a suprimir la replicación celular, sin embargo, induce la activación de los genes de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), de la ciclooxigenasa (COX)-2 y de la superóxido dismutasa (SOD), mientras que un flujo "turbulento" ocasiona que las células se

dividan, y no expresen COX-2 ni SOD (Resnick and Gimbrone, 1995; Topper *et al.*, 1996).

Para determinar el régimen de flujo que se presenta al interior de la vena umbilical perfundida se obtuvo el número de Reynolds. Los valores de velocidad, viscosidad, diámetro y densidad se sustituyeron en la formula:  $N_R = \rho Dv/\mu$ , donde:

$N_R$  = número de Reynolds

$\rho$  = densidad del fluido (1.012 g/cm<sup>3</sup>)

$v$  = velocidad media (900±100µl/min)

$\mu$  = coeficiente de viscosidad (0. 745 cP; 0.903 cP)

$D$  = diámetro de la vena (1.3 mm)

Condición	$N_R$
Ausencia de células	1589.3±176.5
Presencia de células	1311.2±145.6

Tabla 5 | Número de Reynolds en presencia o ausencia de células U937 (3x10<sup>6</sup> células/ml).

Como se muestra en la tabla 5, tanto en ausencia como en presencia de células U937, el  $N_R$  fue < 2000, lo cual indica, que en el interior de la vena umbilical – durante los ensayos de perfusión- se presenta un régimen de tipo laminar.

### ELIMINACIÓN DE LOS CONTENIDOS ENDÓGENOS DE LA VENA

Con los propósitos de lavar la vena de residuos de sangre y de coágulos estudiamos el líquido eluido de la misma. Para ello se perfundieron 10 muestras con medio RPMI-1640 libre de suero durante 20 min, recuperando alícuotas de ~1 ml de medio, cada min. Cada muestra (diluida 1:10) fue medida a diferentes longitudes de onda (200-700 nm) (Fig. 10).

El espectro de absorción obtenido durante los primeros min de lavado mostró tres picos de diferentes longitudes de onda (270, 410 y 558 nm) (Fig. 10, inserto), mismos que descendieron –de manera diferencial- a niveles similares al control (medio RPMI libre de suero), dentro de los primaros 8-9 min de lavado.

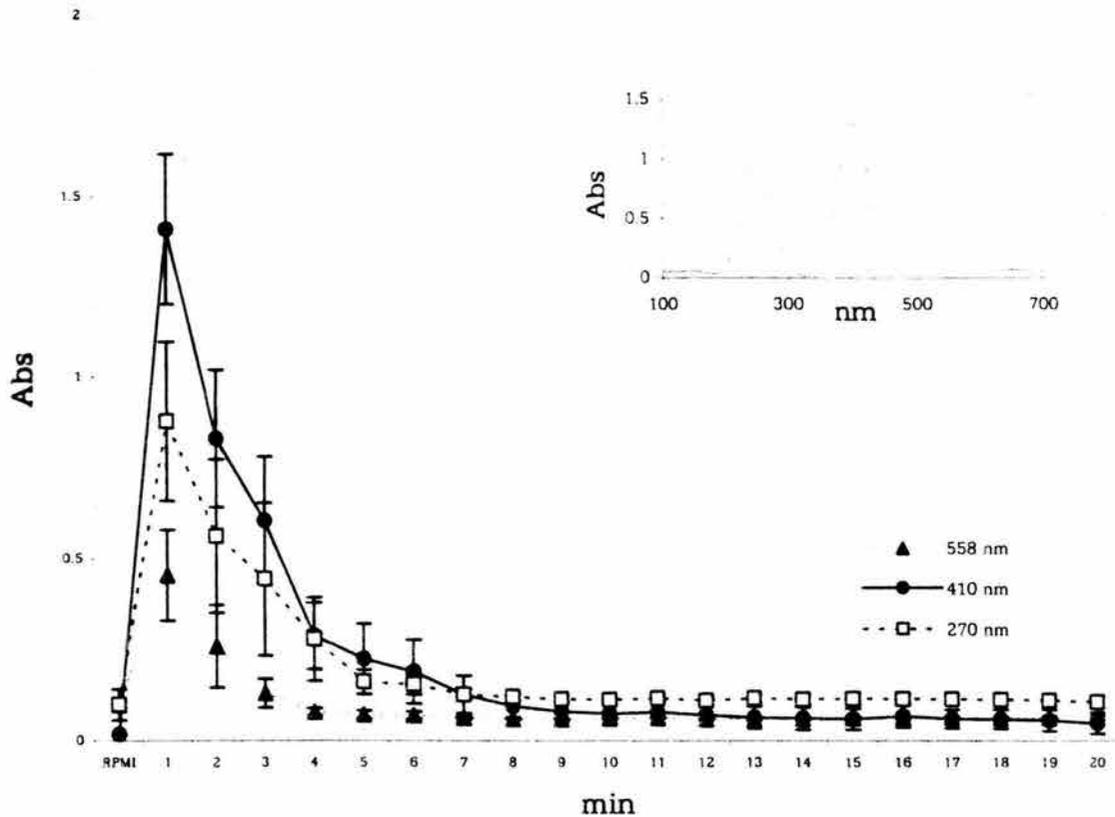


Figura 10 | Absorbancia del eluado a 270, 410 y 558 nm analizada cada min. Experimentos para definir el tiempo y volumen necesarios para limpiar la vena umbilical canulada como se describe en "Material y Métodos". Cada muestra (Dil. 1:10) fue medida a diferentes longitudes de onda (200-700 nm). El inserto representa el espectro de absorción representativo obtenido durante el primer min de elución. Cada valor representa el promedio  $\pm$  SE de la perfusión de 10 cordones independientes.

El pico con menor absorbancia y, el que alcanzó más rápido los valores basales (~4-5 min), fue el de 558 nm; mientras que los dos picos con mayor absorbancia (270 y 410 nm) descendieron a los valores basales ~4 min más tarde que el primero. Por otra parte, los tres picos de absorbancia presentaron una gran variación – reflejada en el error estándar, SE- con respecto al control, lo que sugiere una gran variabilidad en los elementos contaminantes que absorben a estas longitudes de onda, probablemente coágulos y sangre.

De manera paralela, el eluido de cada min fue centrifugado en tubos de 1.5 ml. El volumen diferencial de las pastillas formadas por los componentes sanguíneos (Fig. 11), coincidió exactamente con la disminución en la absorbancia registrada. Estos resultados en conjunto, permitieron definir que el tiempo y volumen de lavado mínimos requeridos para eliminar los componentes endógenos de la vena son de 9-10 min y 10 ml, respectivamente.

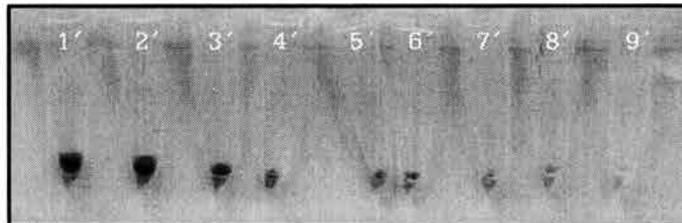


Figura 11 | Contenido endógeno de la vena umbilical. Los números indican el tiempo (min) en que se alicuotaron los eluidos de la vena umbilical.

Para confirmar la eliminación de los componentes endógenos, la vena fue fijada a los 60 seg y 10 min después del lavado, y procesada para microscopía electrónica de barrido (Fig. 12). La imagen de la microscopía de barrido indica que aún después de 1 min de lavado existe una gran cantidad de residuos fibrilares (posiblemente complejos proteicos) localizados en la cara luminal de las células endoteliales, así como eritrocitos (inserto de la figura 12A), mismos que desaparecen después de 10 min de lavado. Con base en estos datos, concluimos que todos los cordones, antes de emplearlos para experimentos de perfusión, deben ser lavados con un volumen de ~10 ml de medio RPMI-1640 libre de suero y con un flujo de 900  $\mu\text{l}/\text{min}$ , lo que ocurre en aproximadamente 10 min.

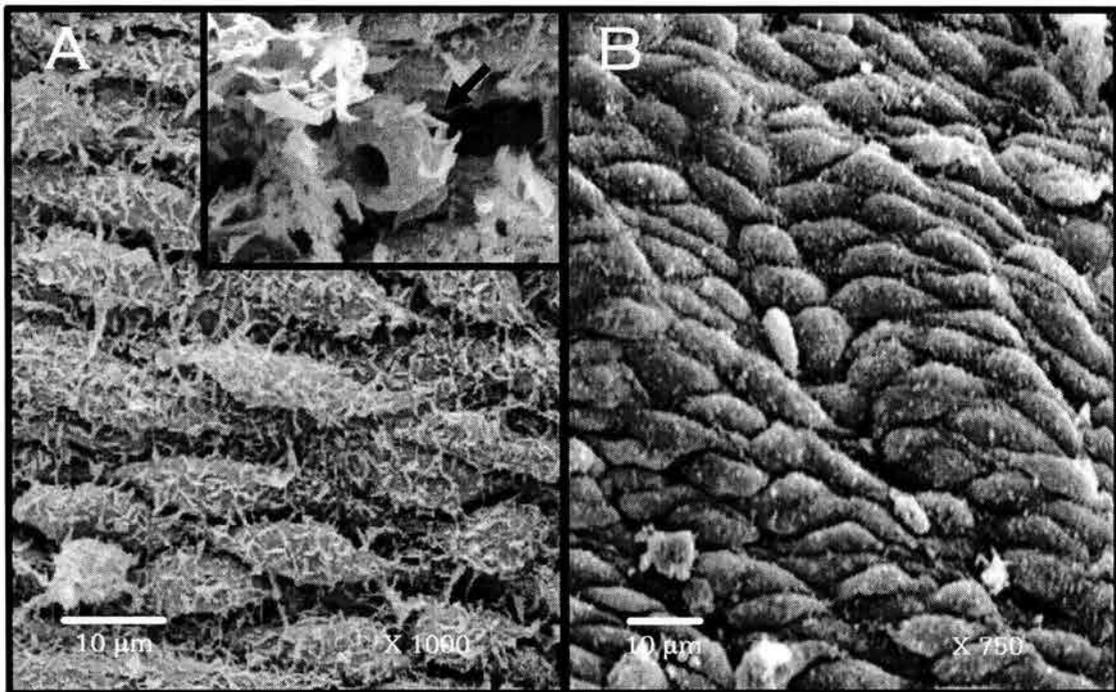


Figura 12 | Eliminación de los componentes endógenos de la vena umbilical. El tejido fue fijado, y procesado para microscopía electrónica de barrido. A) Vena después de 60 seg de lavado. Nótese la gran cantidad de complejos proteicos. El inserto muestra un eritrocito. B) Vena después de 10 min de lavado. Las células endoteliales se encuentran desprovistas de complejos proteicos y eritrocitos.

### DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE PERFUSIÓN DE LA VENA CON TNF- $\alpha$ Y CÉLULAS TUMORALES U937

Para poder evaluar el tiempo óptimo de perfusión de la vena con TNF- $\alpha$  y células tumorales U937 se realizaron diferentes ensayos de adhesión *in vitro*, con el fin de tener valores comparativos. El ensayo de adhesión *in vitro* que se realiza en el laboratorio requiere de 3 h de activación endotelial por TNF- $\alpha$ , seguido por 3 h de co-incubación con células tumorales U937 (“esquema 3+3”). La idea de mantener la preparación de vena umbilical por 6 h nos enfrentaba a problemas de contaminación bacteriana. Con el propósito de reducir al mínimo la duración del ensayo de adhesión acortamos los tiempos de estimulación con TNF- $\alpha$ , sedimentamos las células U937 por centrifugación “SC” y acortamos el tiempo de co-incubación (Fig. 13A y 13B).

La adhesión inducida por el “esquema 3+3” por gravedad (“SG”) alcanzó un valor máximo de ~60% y fue nuestro control positivo. En la figura 13A se aprecia que

ningún grupo sometido a centrifugación ("SC"), incrementó de manera significativa los porcentajes de adhesión con respecto a su propio control ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, la adhesión se ve incrementada significativamente ( $\sim 30\%$ ) a partir de 1.5 h de estimulación, y 1 o 2 h de co-incubación celular (Fig. 13B). No obstante, este porcentaje es mucho menor ( $P < 0.05$ ) con respecto al máximo de adhesión observado por "sedimentación por gravedad" (control positivo).

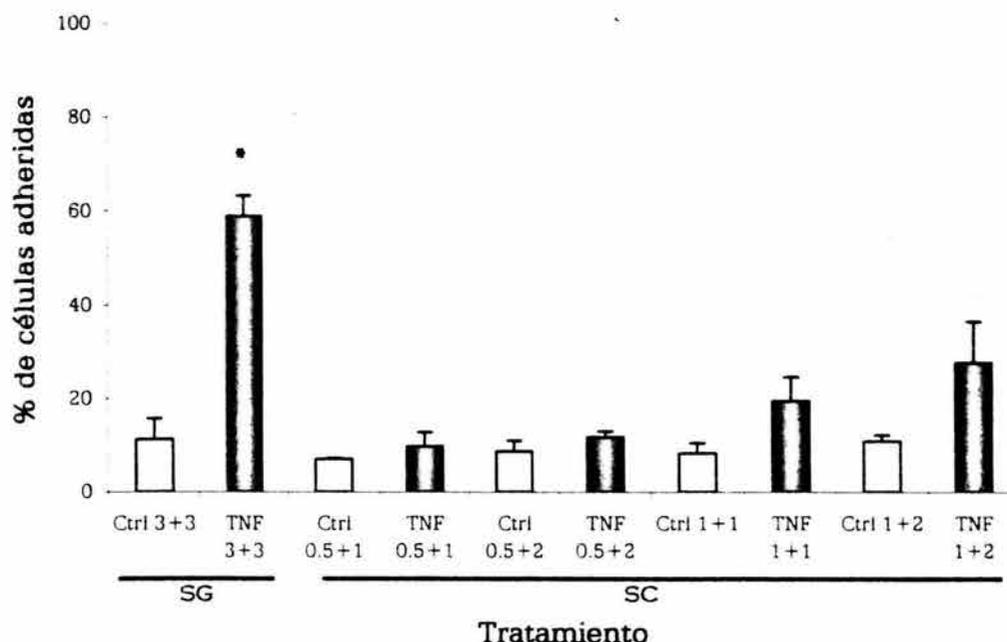


Figura 13A | Ensayo de adhesión con centrifugación. "SG" indica ensayo de adhesión por gravedad, y "SC" indica ensayo de adhesión con centrifugación. El "\*" indica diferencias significativas respecto a su propio grupo control ( $P < 0.05$ ). Se muestra el promedio  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes.

La adhesión inducida por el "esquema 3+3" por gravedad ("SG") alcanzó un valor máximo de  $\sim 60\%$  y fue nuestro control positivo. En la figura 13A se aprecia que ningún grupo sometido a centrifugación ("SC"), incrementó de manera significativa los porcentajes de adhesión con respecto a su propio control ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, la adhesión se ve incrementada significativamente ( $\sim 30\%$ ) a partir de 1.5 h de estimulación, y 1 o 2 h de co-incubación celular (Fig. 13B). No obstante, este porcentaje es mucho menor ( $P < 0.05$ ) con respecto al máximo de adhesión observado por "sedimentación por gravedad" (control positivo). Con 2 h de activación y 1 h de co-incubación, se alcanzaron niveles de adhesión similares al

control positivo (~60%); los cuales no aumentaron aún cuando los tiempos de activación y co-incubación se incrementaron.

Estos resultados en conjunto indican que: (i) con 2 h de estimulación por TNF- $\alpha$  y 1 h de co-incubación celular, son suficientes para alcanzar el máximo de adhesión con respecto a un ensayo de adhesión ordinario ("sedimentación por gravedad"); y (ii) la adhesión intercelular es dependiente del tiempo.

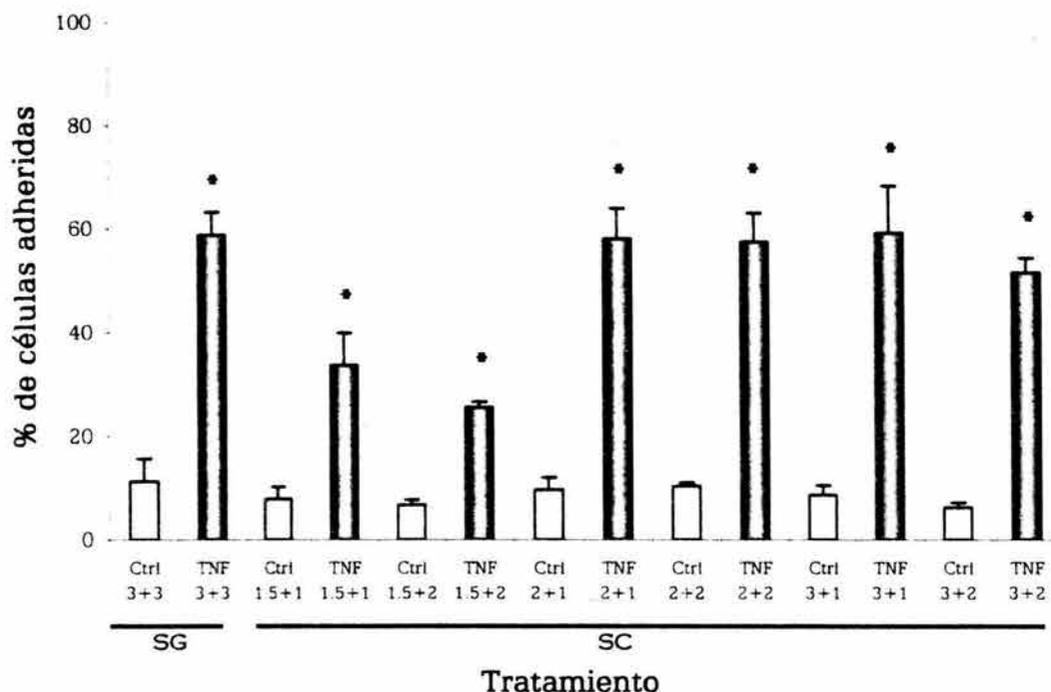


Figura 13B | Ensayo de adhesión con centrifugación. "SG" indica ensayo de adhesión por gravedad, y "SC" indica ensayo de adhesión con centrifugación. El "\*" indica diferencias significativas respecto a su propio grupo control ( $P < 0.05$ ). Se muestra el promedio  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes.

### LA PERFUSIÓN NO ALTERA NI LA INTEGRIDAD NI LA ARQUITECTURA ENDOTELIAL

Con la finalidad de determinar si la perfusión *per se* ocasionaba algún tipo de alteración a la membrana y arquitectura endotelial, se realizaron diferentes aproximaciones, a través del uso de colorantes vitales, ensayos enzimáticos, técnicas histológicas y de microscopía (electrónica y de fluorescencia).

## Viabilidad Endotelial

### a) Integridad Membranal por Tinciones Vitales

Para evaluar la localización de posibles alteraciones espaciales y temporales – ocasionadas por las condiciones de perfusión– en el endotelio vascular, se emplearon dos tinciones vitales: el ioduro de propidio (IP) y el diacetato de diclorofluoresceína ( $H_2DCFDA$ ), que se evaluaron bajo condiciones de microscopia de fluorescencia.

Inicialmente, la vena umbilical fue perfundida a diferentes tiempos, al final de los cuales se adicionó IP ( $0.5 \mu M$ ) al medio de perfusión. Posteriormente, se lavo el interior de la vena, e inmediatamente después se disectó de manera longitudinal y, se realizó un barrido de toda la preparación bajo microscopia confocal.

En todas las regiones analizadas –de ocho venas perfundidas– nunca se detectó fluorescencia nuclear “roja” asociada a IP (Fig. 14A). Estos resultados se contrastaron con venas permeabilizadas con glutaraldehído, en las cuales se observo una gran cantidad de núcleos positivos para IP, identificados como manchas “rojas”, en todas las regiones de la vena (Fig. 14B). Con estos últimos ensayos se realizaron observaciones en diferentes planos focales, lo que permitió observar núcleos tanto de células endoteliales como de músculo liso en un plano superior e inferior, respectivamente. Los núcleos endoteliales presentaron una gran irregularidad en su morfología, ya que en ciertas zonas aparentan ser algo elongados, mientras que en otras parecen ser ovoides.

De manera paralela se empleo la tinción con diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína. Después de 15 min de incubación,  $H_2DCF$  tiño la mayor parte del endotelio vascular y, en algunas zonas también músculo liso, en un plano superior e inferior, respectivamente.

En todas las venas perfundidas y no-perfundidas se detectó fluorescencia asociada a  $H_2DCF$ , la cual fue identificada como “manchas verdes” que corresponden a citoplasmas de células viables (Fig. 15A y 15B). Además, estos resultados se contrastaron con venas permeabilizadas con glutaraldehído, en las cuales nunca se detecto fluorescencia de  $H_2DCF$  (Fig. 15C).

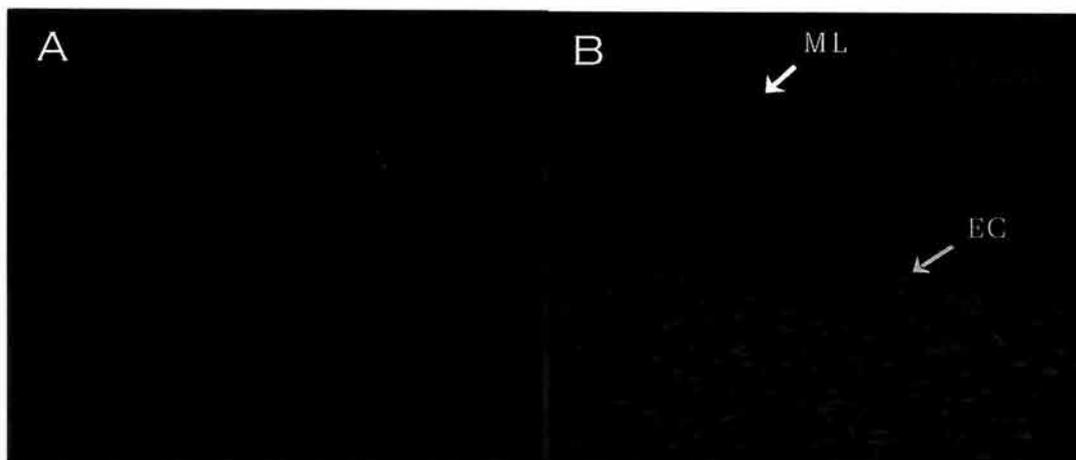


Figura 14 | Integridad membranal evaluada por ioduro de propidio. A) Imagen representativa de la vasculatura perfundida durante 3 h, sin ningún daño aparente. B) Vena permeabilizada con glutaraldehído 4%. Las "manchas rojas" corresponden a núcleos celulares. ML, músculo liso; EC, células endoteliales. X10 (X10 Zoom 1).

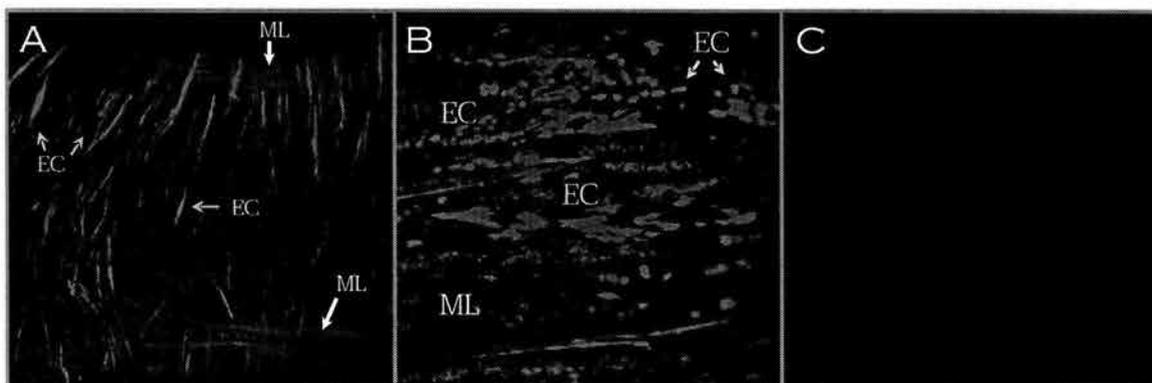


Figura 15 | Integridad membranal evaluada por diacetato de diclorofluoresceína. A) Vena no perfundida. Las "manchas verdes" corresponden a citoplasmas celulares. X10 (X10 Zoom 1). B) Vena perfundida durante 3 h (2 h con  $\text{TNF-}\alpha$  y 1 h con RPMI-1640). Las "manchas verdes" corresponden a citoplasmas celulares. X20 (X10 Zoom 2). C) Vena permeabilizada con glutaraldehído. No se detectó fluorescencia verde asociada con células metabólicamente activas X10 (X10 Zoom 1). ML, fibras de músculo liso; EC, células endoteliales.

Estos resultados sugieren que las condiciones de perfusión (por ejemplo, medio de perfusión, tiempo y fuerza de rozamiento o "shear stress", entre otros) no ocasionan alteraciones en la integridad estructural de la membrana endotelial, ya que las células observadas –con un citoplasma verde– corresponden a células vivas y metabólicamente activas, lo que se confirma con la falta de tinción roja asociada a los núcleos celulares.

b) Integridad Membranal por Lactato Deshidrogenasa

Paralelamente, se determino la posible liberación de enzimas de escape como la lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de perfusión. Estas enzimas se localizan en el citoplasma de todas las células, pero si la membrana se daña las enzimas citosólicas son liberadas al medio, donde pueden detectarse.

Durante la determinación de LDH, se emplearon fibroblastos murinos de la línea L929-P6 como control positivo. Estas células son sensibles al TNF- $\alpha$ , por lo que después de 24 h sufren daño celular, liberando LDH al medio de cultivo (Tabla 6).

% de LDH liberada		
	Control	TNF- $\alpha$
L929 P6	14.4 $\pm$ 0.7	42.7 $\pm$ 5.6

U937	1 h Cultivo	1 h Perfusión
	8.04 $\pm$ 0.6	34.48 $\pm$ 0.1*

Cultivo	2 h RPMI	2 h TNF- $\alpha$
HUVECs	15.4 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.1*
HUVECs + 1 h U937	11.4 $\pm$ 3.3	11.2 $\pm$ 3.1

Perfusión	2 h RPMI	2 h TNF- $\alpha$
Vena	14.7 $\pm$ 6.1	5.87 $\pm$ 0.9*
Vena + 1 h U937	38.2 $\pm$ 2.4	38.1 $\pm$ 2.2

Tabla 6 | Actividad de LDH en el medio de perfusión y/o de cultivo. El \* indica diferencias significativas respecto a su propio control (P<0.05). Se indican los promedios  $\pm$  SD de al menos 4 experimentos independientes.

Se evaluó la actividad de LDH en el medio de perfusión de venas umbilicales perfundidas con o sin TNF- $\alpha$  durante 2 h, al cabo de las cuales se adicionaron células tumorales U937 durante 1 h más. Al término de cada uno de estos período de perfusión (2 y 1 h), el medio fue colectado, centrifugado y almacenado a -70°C.

También se perfundieron células U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml), en ausencia de vena umbilical, con el propósito de valorar su posible contribución a la actividad de LDH detectada en el líquido de perfusión. Además, se analizó la liberación de LDH en el medio de cultivo de células U937 y HUVECs –obtenidas de un fragmento de 5 cm del mismo cordón empleado en las perfusiones–, para comparar los porcentajes respecto a la liberada en el medio de perfusión.

Bajo condiciones de cultivo el porcentaje basal de la actividad de LDH de células L929 y U937 fue de  $\sim 14$  y  $8\%$ , respectivamente (Tabla 6). No obstante, la simple perfusión de células U937 –durante 1 h, sin vena– ocasiona que la actividad se incremente entre 4 y 5 ( $\sim 34\%$ ). Posteriormente, con el fin de determinar cuál era el tiempo crítico de esta liberación, se tomaron alícuotas a los 0, 15, 30, 45 y 60 min de perfusión y, se determinó la actividad de LDH. Como se indica en la figura 16, la liberación de LDH presentó un comportamiento tipo sigmoideal, siendo entre 0-15 y 45-60 min, los tiempos más sensibles a la perfusión. Estos resultados indican que la recirculación *per se* ocasiona un daño significativo a este tipo celular.

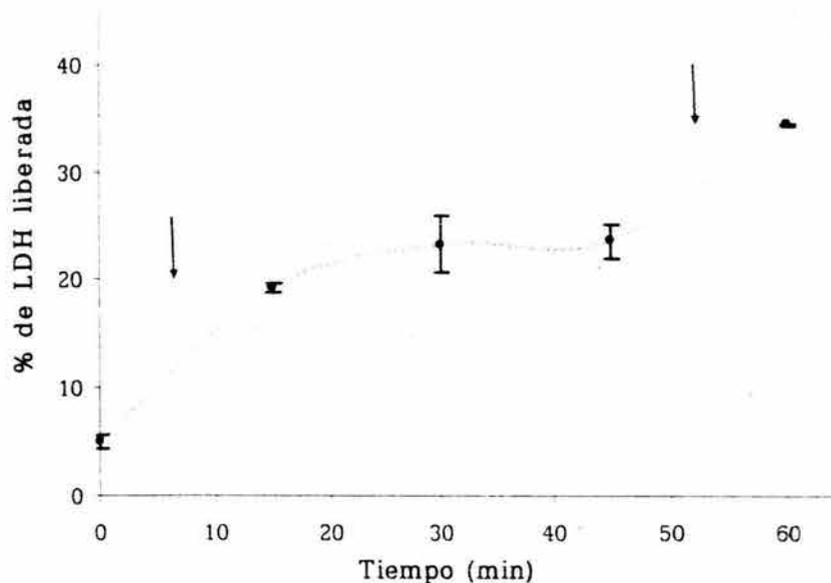


Figura 16 | Curva de liberación de LDH de células U937 perfundidas durante 60 min. Las flechas indican los tiempos más sensibles a la perfusión. Se indican los promedios  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes.

Bajo condiciones estáticas *in vitro* el porcentaje basal de actividad de LDH de HUVECs fue de ~15% (tabla 6). Interesantemente, este porcentaje disminuyó significativamente en presencia de TNF- $\alpha$  (~3%) ( $P < 0.05$ ). Resultados similares fueron obtenidos en el medio de venas perfundidas con o sin TNF- $\alpha$ : ~5 y 14% de LDH, respectivamente ( $P < 0.05$ ). Al realizar un análisis de varianza entre los porcentajes obtenidos *in vitro* y *ex vivo*, no se detectaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Estos resultados sugieren que: (i) la perfusión *per se* no ocasiona un daño significativo a la membrana endotelial; y (ii) el TNF- $\alpha$  afecta al ensayo de LDH.

Por otro lado, la actividad de LDH determinada en el medio de cultivo, cuando se adicionaron células tumorales U937 a HUVECs, fue de ~11%. Este porcentaje fue significativamente mayor que en presencia de TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ), sin embargo, es muy probable que este incremento se deba a la liberación de LDH por parte de las células U937.

En experimentos de venas perfundidas con células U937, el porcentaje de la actividad de LDH fue de ~38%. Este porcentaje es significativamente mayor que en ausencia o presencia de TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ), sin embargo, como ya se menciona, la perfusión ocasiona un daño significativo a las células U937 (liberan ~34% LDH). Esto sugiere que la mayor contribución en la actividad de LDH proviene de las células U937 y no del endotelio vascular.

#### Identificación de las Estructuras del Vaso

Todos los vasos sanguíneos presentan un plano general común de construcción (Bruns and Palade, 1968), consistente de tres capas o tunicas consecutivas. En las venas umbilicales pudimos identificar, por tinción H-E, estas tres estructuras antes y después de las sesiones de perfusión (Fig. 17):

- a) La "túnica íntima" consiste de una capa continua de células endoteliales (apenas visible en la figura 17), cuya superficie luminal o interna esta en contacto con la circulación sanguínea, mientras que la superficie externa o abluminal (de cara al tejido) esta cubierta por la lámina basal que no se aprecia en la figura 17. Subyacente a ésta, se encuentra una estructura laminar

fenestrada, conocida como lámina elástica interna, formada por una membrana tubular y perforada, de sustancia elástica, que tampoco se visualiza.

- b) La "túnica media" está formada principalmente por fibras musculares lisas, las cuales están entremezcladas con fibras de colágena y una red de fibras elásticas (claramente visible en la figura 17). En esta capa también se localizan células de apoyo o pericitos, que contribuyen a la estabilidad de los vasos.
- c) La "túnica externa o adventicia", es una capa discontinua de tejido conjuntivo que comprende elementos celulares (por ejemplo, fibroblastos) y extracelulares (colágena y fibras elásticas), claramente visible en la figura 17.

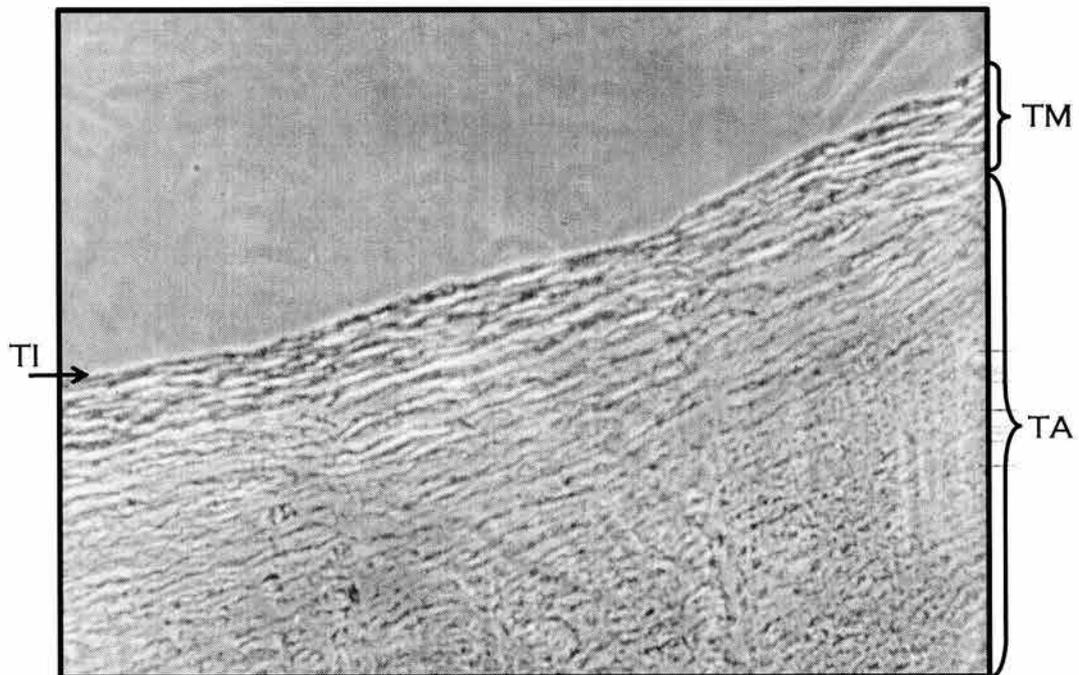


Figura 17 | Identificación de las estructuras clásicas de la vena umbilical humana en un corte transversal. TI, túnica íntima; TM, túnica media; TA, túnica adventicia. Tinción con H-E. X10.

#### d) Estudios Morfológicos por Inmunofluorescencia

Para evaluar la integridad estructural de la monocapa endotelial y del vaso sanguíneo después de las sesiones de perfusión, se examinó por inmunofluorescencia la expresión del factor asociado al factor VIII de coagulación "factor von Willebrad (FVW)" y de  $\beta$ -sarcoglicano en la vena umbilical antes y

después de ser perfundida. El FVW, una glicoproteína multimérica, está almacenado en "vesículas atracadas" adosadas a la membrana apical de las células endoteliales, también denominadas "cuerpos de Weibel-Palade". La activación endotelial lleva a la fusión de las vesículas a la membrana vaciando su contenido en sitios de daño. El FVW actúa como una proteína acarreador para el factor VIII, un cofactor requerido en la coagulación, y promueve la adhesión y agregación plaquetaria (Fischer, *et al.* 1996). Por otro lado, la glicoproteína transmembranal  $\beta$ -sarcoglicano es un miembro del complejo distrofina, que forma un complejo con otras dos proteínas denominadas  $\alpha$ - y  $\gamma$ -sarcoglicano, el cual se localiza en la membrana celular de las fibras de músculo liso, cardíaco, y esquelético, y está ausente de las células endoteliales (Ueda, *et al.* 2001, Barresi *et al.*, 2000). Empleando anticuerpos contra estas dos proteínas se puede distinguir fácilmente al endotelio vascular del músculo liso.

Las diferentes secciones de venas perfundidas y no perfundidas fueron tratadas con anticuerpos contra FVW y  $\beta$ -sarcoglicano, y examinadas por microscopia de fluorescencia. En concordancia con los estudios anteriores de viabilidad, la inmunofluorescencia para FVW siempre remarcó un endotelio continuo en la zona marginal de venas perfundidas con o sin TNF- $\alpha$  por 2-4 h (Fig. 18A y 19).

En la figura 18B, se muestran células musculares positivas para  $\beta$ -sarcoglicano (fluorescencia roja), y en la zona marginal no teñida se pueden observar núcleos celulares que muy probablemente corresponden a células endoteliales posicionadas en esta zona.

En todas estas imágenes, se pueden observar núcleos teñidos en color azul con DAPI. En general los núcleos de las células musculares aparecen elongados y aplanados, mientras que los núcleos endoteliales presentan una forma irregular, consistentes con descripciones previas de la literatura.

Estos resultados confirman que las condiciones de perfusión no alteran la estructura continua de la monocapa endotelial.

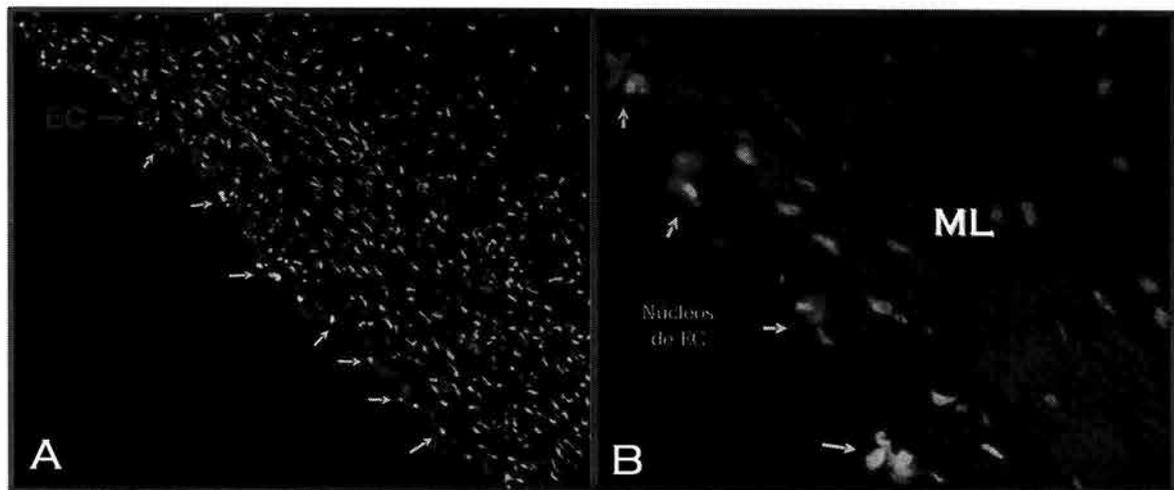


Figura 18 | Inmunofluorescencia de la vena umbilical humana perfundida durante 3 h. Después de 2 h de estimulación con TNF se perfundieron células U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml) por 1 h más. A) Células endoteliales (EC) positivas para FVW (fluorescencia roja) en la zona marginal del vaso. Las flechas indican núcleos celulares teñidos en azul con DAPI. X10. B) Células musculares (ML) positivas para  $\beta$ -sarcoglicano (fluorescencia roja) en la túnica media y adventicia. Las flechas indican núcleos de células endoteliales en la zona marginal del vaso. X40.

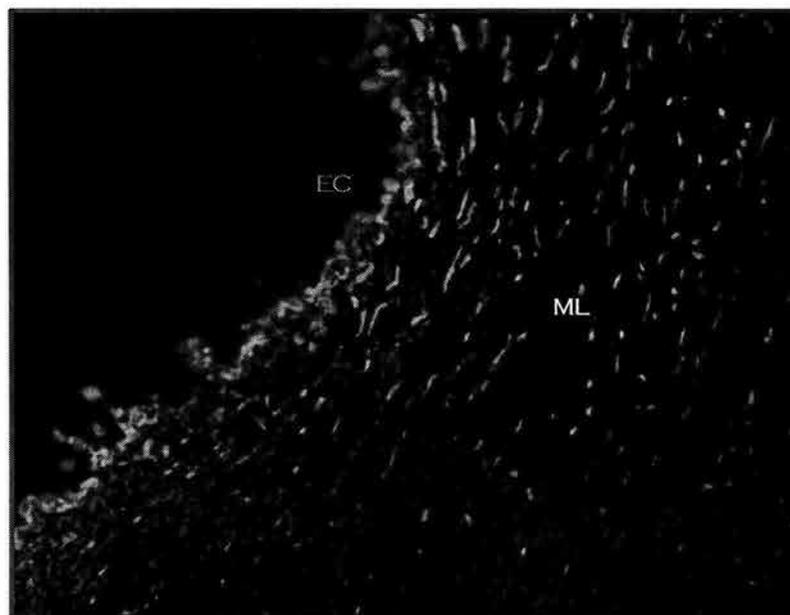


Figura 19 | Triple tinción. Células endoteliales (EC) (fluorescencia verde) y de músculo liso (ML) (fluorescencia roja) fueron positivas para FVW y  $\beta$ -sarcoglicano, respectivamente. Núcleos celulares teñidos en azul con DAPI. X20.

### Estudios Morfológicos por Microscopía Electrónica de Barrido

Finalmente, la integridad estructural de la monocapa endotelial fue estudiada por microscopía electrónica de barrido (SEM). En la figura 20, se aprecia que aún después de 3 h de perfusión, las células endoteliales continúan formando una monocapa continúa e íntegra.

La morfología de la monocapa endotelial varió entre diferentes zonas de una misma vena y, también, en distintas venas umbilicales. En ciertas zonas, las células endoteliales presentaron un acoplamiento tipo "cable" –formando un sincicio anatómico– (Fig. 20B y 20C), en dirección paralela al flujo sanguíneo. Mientras que en otras zonas, se distinguen células endoteliales "individuales" que presentaron una forma elongada, hexagonal y fusiforme (Fig. 20A). Típicamente, las células endoteliales "individuales" presentaron de cuatro a ocho células endoteliales vecinas (Fig. 20A) y las dimensiones de las células variaron ampliamente ( $3\text{-}8.8 \times 10\text{-}27 \mu\text{m}$ ) (Tabla 7). Longitudinalmente, las células más pequeñas presentaron medidas de  $4.7 \times 10 \mu\text{m}$ , mientras que las más grandes tuvieron medidas de  $3 \times 27 \mu\text{m}$ . Estas dimensiones son comparables a las reportadas para vasos sanguíneos de otros mamíferos (principalmente murinos,  $\sim 10 \times 30 \mu\text{m}$ ) (Bruns and Palade, 1968; Wenk *et al.*, 1974).

Esta heterogeneidad morfológica del endotelio –en distintos sitios anatómicos– ha sido observada desde los años 1970s (Majno and Joris, 1978). Sin embargo, en la actualidad se desconocen –ampliamente– las bases moleculares de este fenómeno. Romanov *et al.* (1995) propusieron que este polimorfismo morfológico podría deberse a la heteroploidia e hipertrofia de parte de las células mononucleadas y multinucleadas.

Dimensiones de las células endoteliales individuales	
Ancho	Largo
$6.3 \pm 1.3 \mu\text{m}$	$20.0 \pm 4.9 \mu\text{m}$

Tabla 7 | Dimensiones de células endoteliales individuales de venas perfundidas durante 3 h. Se indican los promedios  $\pm$  SD del ancho y largo de las células.

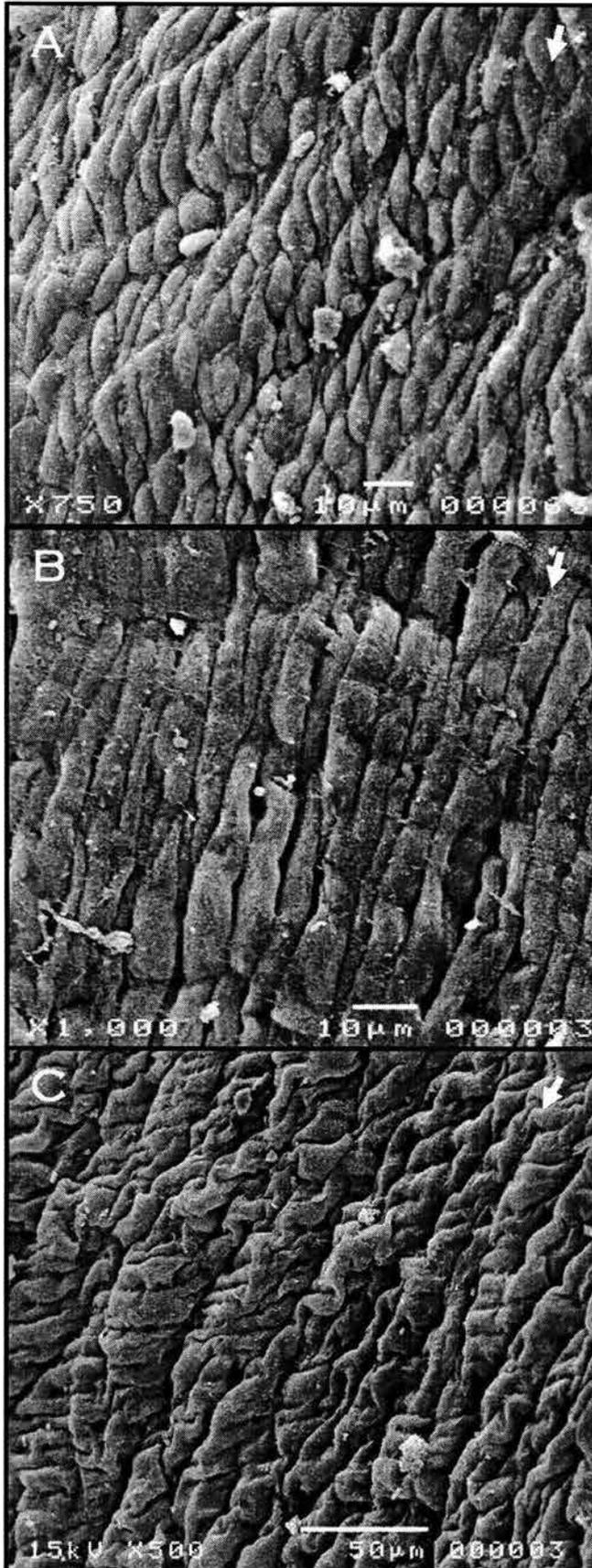


Figura 20 | Heterogeneidad morfológica de las células endoteliales de venas profundas durante 3 h. El endotelio vascular aparece íntegro e intacto. Las células endoteliales se presentaron como células "individuales" (A) o con una apariencia tipo "cable" (B y C). En (B) se aprecia un endotelio con una superficie relativamente "lisa", mientras que en (C) se observa una superficie "rugosa". Las flechas indican la dirección del flujo.

Por otra parte, la superficie luminal de las células endoteliales varió de lisa a rugosa (Fig. 20B y 20C). Llama la atención, que en muchas instancias dicha superficie está revestida por una cubierta molecular (el glicocalix) (Fig. 21). Wenk *et al.* (1974), reportaron observaciones similares en células endoteliales altas (HEV). Empleando microscopía electrónica de transmisión (TEM), describieron que este revestimiento –con un espesor de  $\sim 150 \text{ \AA}$ – está compuesto por un fino material filamentoso y de gránulos gruesos. Ambas características fueron observadas en distintas zonas del endotelio umbilical (Fig. 21).

Estos resultados sugieren que esta “cubierta” no es exclusiva de vénulas post-capilares de nódulos linfoides, ya que también se observó en el endotelio vascular de venas umbilicales humanas perfundidas.

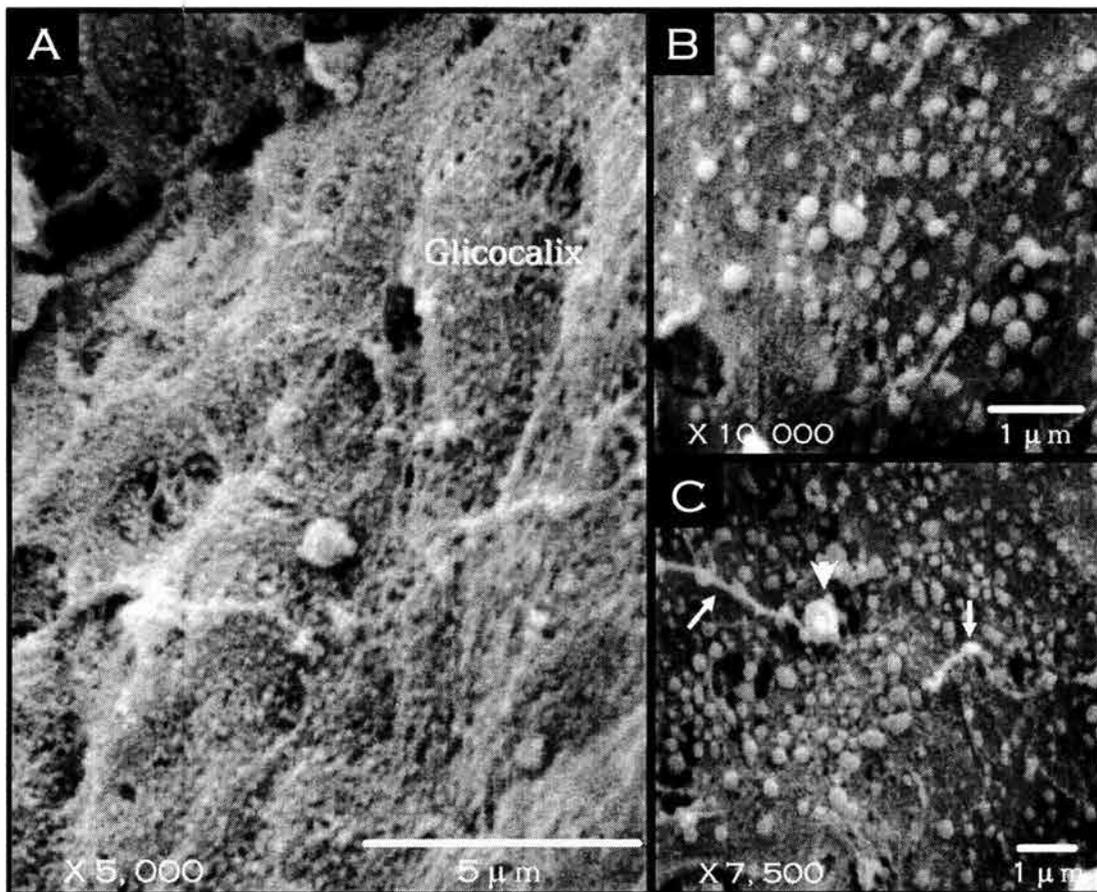


Figura 21 | La superficie luminal del endotelio está revestida de una cubierta molecular, el glicocalix. A) Se aprecia un revestimiento celular formado por filamentos y gránulos. En (B) y (C) se muestran gránulos asociados al glicocalix. El tamaño de estos gránulos varío ampliamente (rango de  $\sim 0.1$ - $0.6 \mu\text{m}$ ). C) Las flechas indican un tipo de material filamentoso, mientras que la punta de la flecha indica un prominente gránulo.

---

## EL ENDOTELIO VASCULAR PERFUNDIDO RESPONDE A LA ESTIMULACIÓN POR FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ )

A continuación nos propusimos definir si el endotelio vascular presente en la vena perfundida era capaz de responder a estímulos fisiológicos adicionados en forma externa durante la perfusión. Por tanto, se evaluó la producción de nitratos/nitritos en el medio de perfusión, como una medida indirecta de la producción de óxido nítrico endotelial en respuesta a su activación con TNF- $\alpha$ .

Las células endoteliales producen sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico, y la prostaciclina. El óxido nítrico (NO), un radical diatómico, juega una variedad de funciones reguladoras *in vivo*, incluyendo vasodilatación, neurotransmisión/neuromodulación, y actividad citotóxica (Ignarro *et al.*, 1999). Se ha identificado más de una isoforma de la sintetasa de óxido nítrico (NOS), que normalmente está constituida por subunidades homodiméricas con pesos moleculares entre 125 y 155 KDa: (i) hay dos isoformas que se expresan en forma constitutivas y que son calcio-dependientes; la endotelial (eNOS) o tipo III y la neuronal (nNOS) o tipo I, presentes en diferentes tejidos (células endoteliales, neuronas, neuroglías, entre otros) que producen concentraciones fisiológicas de NO al actuar como molécula de señalización intracelular; y (ii) una isoforma calcio-independiente o tipo II, la NOS inducible (iNOS), la cual se expresa en una variedad de tipos celulares como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, y células endoteliales en respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como IFN- $\gamma$ , IL-1, o TNF- $\alpha$ , y lipopolisacárido bacteriano (LPS). Una vez que se expresa la iNOS, se pueden generar altas concentraciones de NO por periodos prolongados de tiempo (Ignarro *et al.*, 1999).

El NO es una molécula inestable y reacciona con especies de oxígeno y moléculas biológicas para formar diferentes productos finales *in vivo*, que incluyen nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). El mejor índice de la producción de óxido nítrico total es la suma de ambos productos, debido a que la proporción relativa de cada uno de ellos dentro de una misma muestra resulta variable (de Assis *et al.*, 2002).

La concentración de nitratos/nitritos en el medio de perfusión y, en el sobrenadante de células cultivadas (control positivo) fue determinada por un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Griess (Green *et al.*, 1982). En la

figura 22 se muestra la curva estándar, que presentó un rango lineal entre 5 y 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{KNO}_3$ , con un coeficiente de regresión lineal  $r^2$  de 0.997.

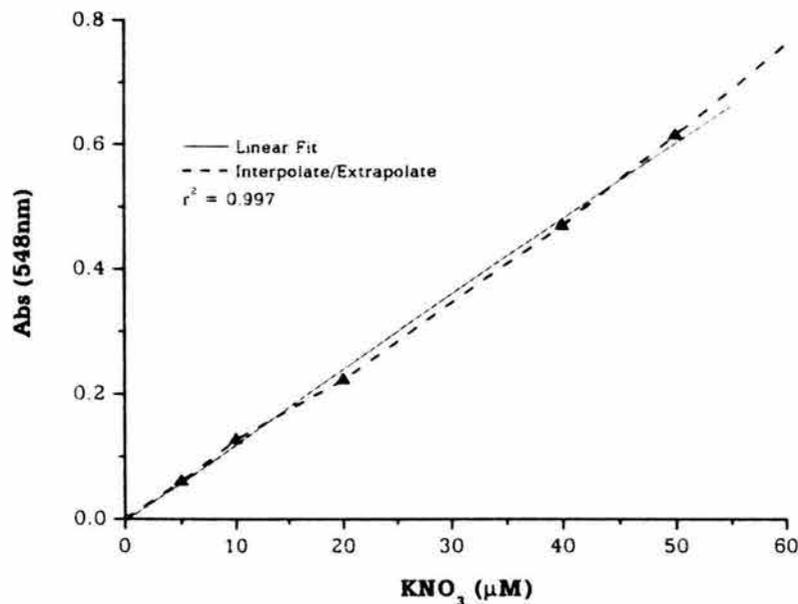


Figura 22 | Curva estándar para la detección de nitratos por la reacción de Griess. Estándares de  $\text{KNO}_3$  (5-50  $\mu\text{M}$ ) fueron preparados. 500  $\mu\text{l}$  de muestra se incubaron con Cd, y posteriormente se adicionaron 1.5 ml del reactivo de Griess para formar un color azo-púrpura. El color del producto se desarrolló a temperatura ambiente, y se determinó su absorbancia a 548 nm. Los resultados se corrigieron de acuerdo a la cantidad de nitratos presentes en el medio de perfusión RPMI-1640. La línea continua indica la regresión lineal, mientras que la línea punteada indica los datos inter- y extrapolados.

Para medir nitratos/nitritos en el medio de perfusión, la vena umbilical fue perfundida con o sin  $\text{TNF-}\alpha$  durante 2 h. Al término de este período, el medio fue colectado, centrifugado y almacenado a  $-70^\circ\text{C}$ . De manera paralela, se analizó la liberación de nitratos/nitritos en el medio de cultivo de HUVECs obtenidas de un fragmento de 5 cm de vena umbilical del mismo cordón empleado en las perfusiones como control positivo.

Como se puede observar (tabla 8), bajo condiciones de cultivo la concentración basal de nitratos/nitritos de HUVECs fue de  $9.03 \mu\text{M}$ . Sin embargo, la presencia de  $\text{TNF-}\alpha$  (1 ng/ml), ocasionó un incremento significativo en más del 50% respecto a la basal ( $15.67 \mu\text{M}$ ) ( $P < 0.05$ ). Estos resultados sugieren que el  $\text{TNF-}\alpha$  pudo haber estimulado la producción de NO mediante la activación de la iNOS.

Nitratos/Nitritos ( $\mu\text{M}$ )		
<i>In vitro</i>	2 h RPMI	2 h TNF- $\alpha$
HUVECs	9.03 $\pm$ 1.1	15.67 $\pm$ 1.4*

Nitratos/Nitritos ( $\mu\text{M}$ )		
Perfusión ( <i>ex vivo</i> )	2 h RPMI	2 h TNF- $\alpha$
Vena	23.24 $\pm$ 6.7*	39.27 $\pm$ 4.1**

Tabla 8 | Producción de nitratos/nitritos por células endoteliales *ex vivo* e *in vitro*. RPMI, indica la producción basal de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>; y TNF, la producción inducida por el TNF- $\alpha$ . El \* indica diferencias significativas respecto a su propio control (2 h RPMI), y \*\* indica diferencias significativas respecto a HUVECs (P<0.05). Se indican los promedios  $\pm$  SD de al menos 4 experimentos independientes.

Bajo condiciones de perfusión, la concentración basal de nitratos/nitritos en el medio de venas perfundidas fue de 23.24  $\mu\text{M}$ . De manera similar a lo que ocurrió *in vitro*, el TNF- $\alpha$  incrementó las concentraciones de nitratos/nitritos de manera significativa (P<0.05). Interesantemente, tanto las concentraciones basales de nitratos/nitritos como las inducidas presentes en el medio son muy diferentes. Al aplicar un análisis de varianza entre las diferentes concentraciones, se detectaron diferencias significativas (P<0.05).

Estos resultados sugieren que el endotelio vascular perfundido no solo es viable sino que además conserva la capacidad de responder a estímulos externos, como el del TNF- $\alpha$ .

#### ADHESIÓN *IN VITRO* POST-PERFUSIÓN

Habiendo encontrado que la perfusión *per se* ocasiona daño significativo a las células U937, se realizaron ensayos de adhesión *in vitro* con células que habían sido perfundidas durante 1 h, con el propósito de definir si las células U937 retenían su capacidad de adhesión aún después de ser sometidas a flujo.

Interesantemente, después de ser perfundidas durante 60 min, más del 90% de las células recirculadas que se recuperaron fueron viables. Esto se determinó por tinción la exclusión de azul de tripano como índice de detección de las células

muertas. Al término de los ensayos de adhesión *in vitro* las células fueron fijadas, teñidas con yoduro de propidio y analizadas por microscopía confocal.

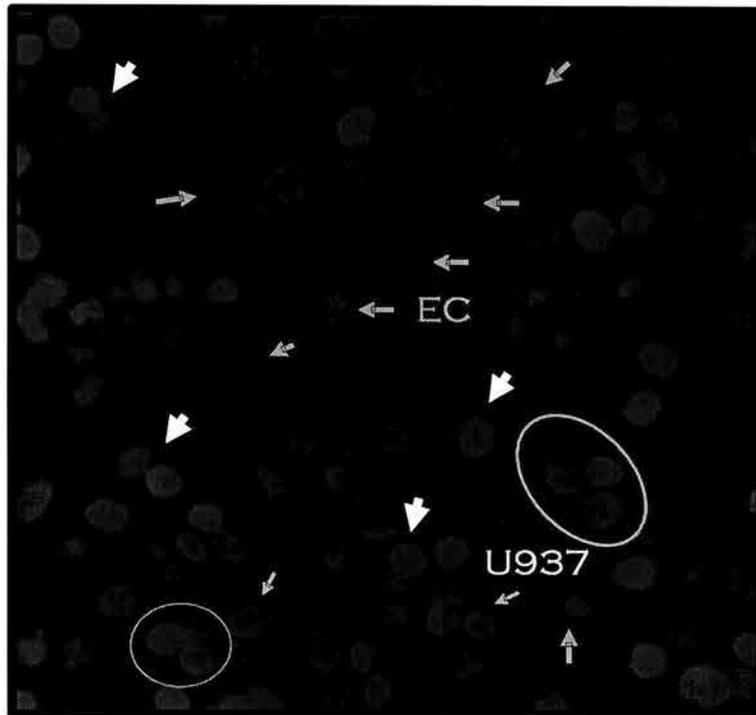


Figura 23 | Las células U937 retienen su capacidad de adhesión aún después de haber sido re-circuladas en el sistema de perfusión. Imagen virtual: superposición de la imagen de transmisión (azul) y la de fluorescencia del yoduro de propidio (rojo). Ensayo de adhesión *in vitro* post-perfusión. Las células U937 fueron perfundidas durante 60 min. Las flechas amarillas indican núcleos de células endoteliales (EC), mientras que las blancas pequeñas indican núcleos de células U937. Las flechas blancas grandes indican núcleos de células EC y U937 que interactúan. Los "círculos" indican más de una célula tumoral por EC. X25 (X10 Zoom 2.5).

Los resultados muestran células tumorales U937 adheridas a HUVECs –activadas por  $\text{TNF-}\alpha$ – después de ser re-circuladas a través del sistema de perfusión (Fig. 23). En el plano superior se distingue a los núcleos de las células tumorales U937 con una tinción intensa mientras que en el plano inferior se observaron los núcleos de las células endoteliales (EC) más elongados y con una tinción menos intensa. Estos resultados muestran que las células tumorales U937 retienen su capacidad de adhesión a HUVECs aún después de ser perfundidas durante 60 min.

### MARCAJE DE CÉLULAS TUMORALES U937

En estudios de microscopía intravital, la aproximación más reciente para contrastar y visualizar las interacciones entre células tumorales y la microvasculatura *in vivo*, es el empleo de diferentes marcadores fluorescentes. En estos ensayos se recomienda que el marcaje de las células tumorales sea citoplásmico y no nuclear, ya que se ha observado que la tinción con naranja de acridina produce ruptura de membranas y lisis celular dentro de los primeros min después de ser inyectadas a la circulación. Además, se ha reportado que este colorante puede modificar la expresión de la integrina  $\beta 2$  (Abbitt *et al.*, 2000). En contraste, tinciones citoplásmicas con calceína-AM o con micro-esferas fluorescentes, la integridad de la membrana se preserva (Chambers *et al.*, 1995).

Debido a estos antecedentes y con el propósito de visualizar la adhesión de células tumorales U937 al endotelio de la vena perfundida *in ex vivo*, se realizaron las siguientes aproximaciones: (i) marcar células U937 con el fluorocromo PKH26; y (ii) teñir vasculatura con H<sub>2</sub>DCFDA.

#### Tinción de células U937 con PKH26

El colorante PKH26 (Kit PKH26-GL, Sigma Co.), un fluorocromo rojo que tiene una excitación a 551 nm, emitiendo a 567 nm, se incorpora dentro de la membrana celular como una molécula alifática. De acuerdo con las especificaciones del proveedor este fluorocromo tiñe células vivas por períodos de hasta 100 días, sin ningún efecto tóxico aparente. Entre las principales aplicaciones *in vivo* de este colorante destacan: migración, "homing" de leucocitos, proliferación, diferenciación, control del crecimiento, embriogénesis, inmunidad antitumoral, presentación de antígenos, e interesantemente adhesión (Horan and Slezak, 1989). Debido a ello, se decidió emplear este fluorocromo para hacer visibles a las células U937, y posteriormente realizar un ensayo de adhesión *in vitro* con valuar su posible interferencia con la adhesión al endotelio, dado que este fluorocromo se inserta en la membrana celular.

Como se puede apreciar (Fig. 24), la tinción de células U937 con el fluorocromo PKH26 no afecto la morfología celular, sin embargo, su incorporación a la membrana celular no fue homogénea, ya que la membrana de algunas células se

tiñó con mayor uniformidad e intensidad que otras. La tinción fue evaluada durante cinco días, a través de los cuales la intensidad de la tinción disminuyó, perdiéndose de manera definitiva después 3 a 5 días post-marcaje (datos no mostrados).

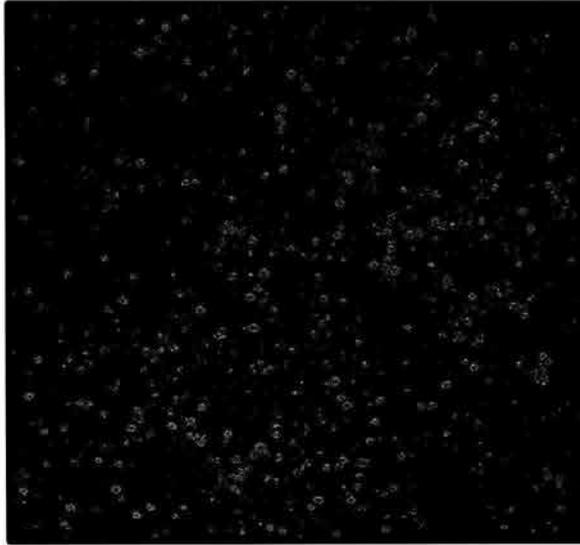


Figura 24 | Células U937 teñidas con el fluorocromo PKH26. Imagen virtual que superpone la imagen de transmisión (azul) y la de fluorescencia (roja). La fluorescencia fue evaluada 60 min post-tinción. Nótese que la tinción no es homogénea. X10 (X10 Zomm 1).

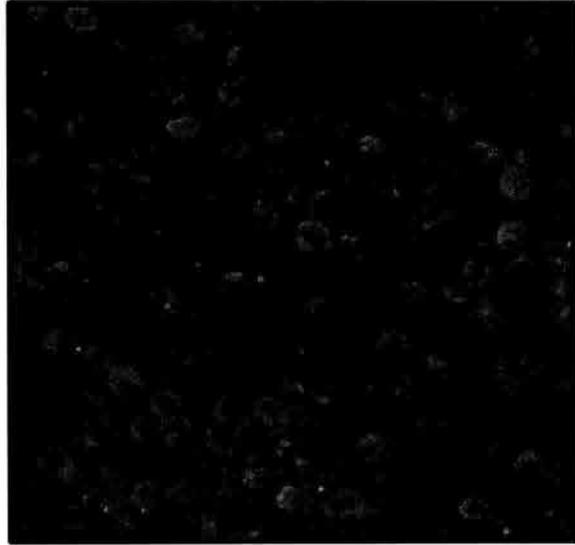


Figura 25 | La adhesión *in vitro* de células tumorales U937 a células endoteliales no se afecta por el fluorocromo PKH26. Imagen virtual que superpone la imagen de transmisión (azul) y la de fluorescencia (roja). Ensayo de adhesión *in vitro* con células U937 teñidas con PKH26. X25 (X10 Zoom 2.5).

Una vez teñidas, las células U937 se emplearon en ensayos de adhesión *in vitro*. En la figura 25, se muestra que la tinción –con el fluorocromo PKH26- no interfiere con la adhesión entre células tumorales U937 y HUVECs bajo condiciones estáticas *in vitro*. Por lo tanto, procedimos a emplear las células U937 teñidas con este fluorocromo en ensayos de perfusión *ex vivo*, y analizar mediante microscopía confocal la adhesión entre células tumorales U937 y el endotelio vascular *in situ*.

## ADHESIÓN DE CÉLULAS TUMORALES A LA VASCULATURA DE LA VENA UMBILICAL HUMANA PERFUNDIDA

La habilidad de células tumorales U937 para desarrollar interacciones adhesivas firmes con el endotelio vascular –bajo condiciones de flujo–, fue examinada usando un nuevo modelo *ex vivo* de vena umbilical humana perfundida.

Una suspensión de células U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml) fue perfundida a través de venas umbilicales pre-tratadas con o sin TNF- $\alpha$  (para descripción ver “Sistema de perfusión”, al inicio de esta sección). La interacción de estas células con la vasculatura fue examinada por microscopía óptica, de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido y transmisión.

Diferentes métodos de cuantificación han sido exitosamente empleados, tales como: ensayos de actividad enzimática, evaluación por microscopía, y la cuantificación de radioactividad o fluorescencia de células previamente marcadas. No obstante, aunque se requiere una labor más intensa, la evaluación directa por microscopía permite una valoración cualitativa como cuantitativa más directa de células unidas; por ejemplo, se puede distinguir la unión de agregados o cúmulos de células de células individuales unidas a la monocapa endotelial.

### Evaluación de la adhesión por tinción H-E

Una de las técnicas más utilizadas en histología es la tinción hematoxilina-eosina. La hematoxilina es un colorante básico que tiñe núcleos, mientras que la eosina es un colorante ácido que tiñe citoplasmas.

Los resultados indican claras diferencias entre venas estimuladas y no estimuladas con citocinas pro-inflamatorias. En general, la estimulación de células endoteliales con TNF- $\alpha$  fue responsable de la adhesión intercelular de células U937 a la vasculatura en experimentos de flujo, mientras que en venas perfundidas sin TNF- $\alpha$  nunca se observó adhesión (Fig. 26). No obstante, con esta aproximación no se pudo observar si las células tumorales se adhirieron en o cerca de las uniones intercelulares de la monocapa endotelial. Todas las células adheridas al endotelio presentaron una morfología esférica. Además en cortes seriados, se pudo apreciar que en ciertas zonas no se adhirieron células tumorales, mientras que en otras se presentaron más de una célula. En la figura 26A, se observa que entre la célula “1”

y "2" existe una zona considerable desprovista de células (~140  $\mu\text{m}$ ), mientras que en la zona donde se localizaron las células "2" y "3", el espacio entre ambas fue de solo ~20  $\mu\text{m}$ . Este fenómeno fue observado en distintas zonas de una misma muestra, y también en diferentes preparaciones.

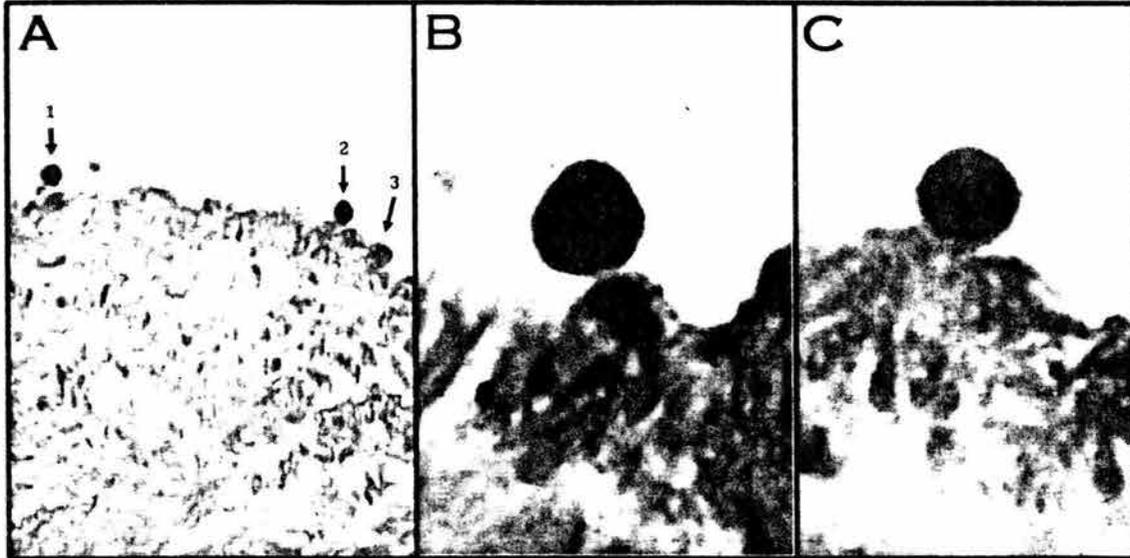


Figura 26 | Imágenes de células tumorales U937 adheridas a la monocapa endotelial estimulada con  $\text{TNF-}\alpha$ . Vena perfundida durante 2 h con  $\text{TNF}$ , seguido de 1 h de infusión con células U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml). Al término, la vena fue incluida en Tissue-Tek y procesada para tinción con hematoxilina-eosina. A) Las flechas indican tres células U937 adheridas a la vasculatura. X20. B y C) Dos de las tres células visualizadas en (A) observadas a mayor aumento. Nótese que ambas células están firmemente adheridas a la vasculatura. X100.

**Visualización de la interacción célula tumoral-endotelio *in situ* con tinciones vitales**

Con el fin de observar la adhesión a la vena umbilical *in situ*, se emplearon tinciones vitales para visualizar tanto la vasculatura como células U937. Para ello la vena umbilical fue perfundida con o sin  $\text{TNF-}\alpha$  durante 2 h. Al final de este período la preparación fue perfundida con medio de perfusión libre de suero adicionado con  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  8  $\mu\text{M}$  durante 15 min. Posteriormente, se adicionaron y perfundieron células U937 –marcadas previamente con PKH26– durante 1 h. Finalmente, la vena se disectó de manera longitudinal y, se realizó un barrido de toda la preparación bajo microscopia confocal. De manera que, la vasculatura fue reconocida por fluorescencia verde asociada con  $\text{H}_2\text{DCF}$ , mientras que las células tumorales fueron visualizadas en color rojo (fluorescencia asociada con PKH26).

Con esta doble tinción, se observaron interacciones heterotípicas entre células tumorales y células endoteliales de venas pre-tratadas con TNF- $\alpha$  (Fig. 27A) (la superposición de la tinción membranal roja de PKH26 sobre la tinción verde de H<sub>2</sub>DCF asociada a la vasculatura, generó fluorescencia amarilla en las imágenes). En contraste, en venas perfundidas sin TNF- $\alpha$ , no se observó adhesión (Fig. 27B). Estos resultados sugieren que H<sub>2</sub>DCF y PKH26 no afectan la adhesión intercelular bajo condiciones de flujo.

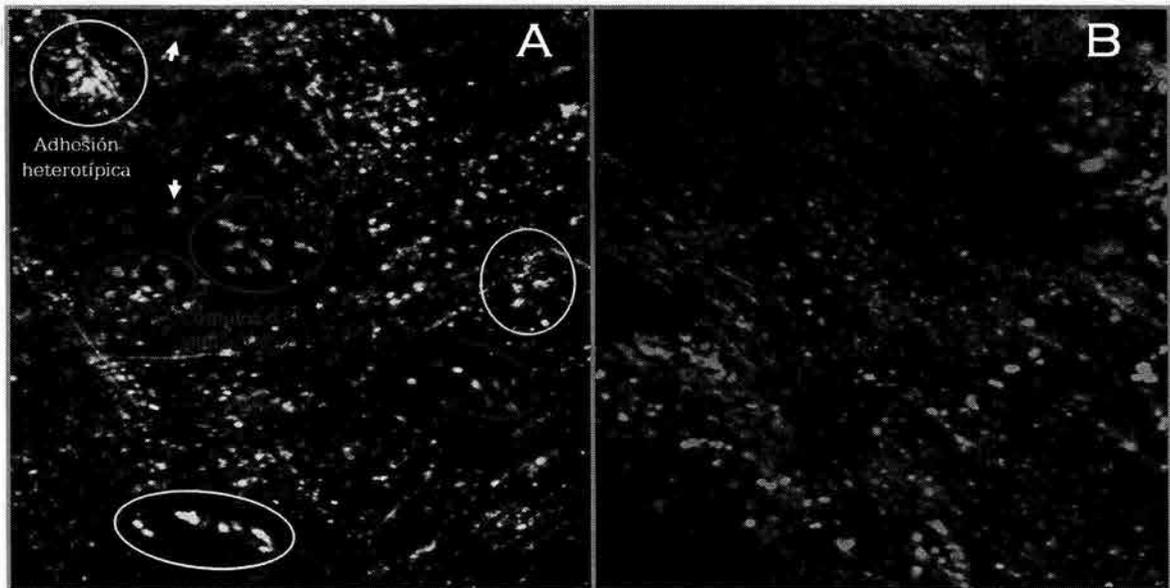


Figura 27 | Imágenes de células tumorales U937 adheridas a la monocapa endotelial estimulada con TNF- $\alpha$ . Después de estimular con TNF- $\alpha$  por 2 h se perfundieron células U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml) por 1 h más. A) Las flechas en blanco indican células tumorales individuales, mientras que los círculos en rojo indican agregados o cúmulos celulares de células U937. Los círculos en amarillo indican interacciones heterotípicas entre células endoteliales y U937. X10. B) En la vena control no se observaron células tumorales adheridas a la vasculatura umbilical. X10 (X10 Zoom 1).

Por otra parte, reportes recientes indican que el proceso de adhesión, no solo involucra interacciones heterotípicas, sino también de tipo homotípico entre células tumorales, de manera que se forma un agregado celular que puede facilitar la extravasación de las células metastásicas (Glinsky, *et al.*, 2000). En el presente trabajo se observaron pequeños agregados de células tumorales U937 en los sitios de firme adhesión en diferentes preparaciones, lo que sugiere que también se dan interacciones de tipo homotípico entre estas células (Fig. 27A). También, se

observaron células tumorales adheridas de manera individual (Fig. 27A, flechas blancas).

De manera similar a lo observado con hematoxilina-eosina, en ciertas secciones de una misma muestra analizada, y en diferentes preparaciones, se observaron múltiples células tumorales adheridas establemente al endotelio, mientras que otras regiones permanecieron libres de células neoplásicas. Esto puede sugerir que existen zonas más propensas a la adhesión y por ende a desarrollar metástasis que otras.

#### Visualización de la interacción célula tumoral-endotelio por inmunofluorescencia

De manera paralela, se emplearon anticuerpos para reconocer antígenos específicos de endotelio y de células tumorales U937 en cortes en criostato. Para lo cual, se perfundieron venas umbilicales con células U937, y se procesaron para inmunofluorescencia indirecta como se indica en "Materiales y Métodos".

Como una primera aproximación, solo se empleo el anticuerpo anti-FVW que reconoció un endotelio continuo en la zona marginal de venas profundidas (Fig. 18 y Fig. 19). Interesantemente, sobre el endotelio –pre-tratado con TNF- $\alpha$ - se observaron núcleos celulares teñidos con DAPI, que –muy posiblemente- corresponden a núcleos de células tumorales U937 (Fig. 28), ya que: (i) presentaron una forma esférica, a diferencia de los núcleos endoteliales y/o musculares –aplanados y elongados-; y (ii) porque en general las células neoplásicas presentan un núcleo más prominente que las células no-neoplásicas (y por tanto una mayor intensidad de fluorescencia; Fig. 28). En contraste, en venas profundidas sin TNF- $\alpha$  nunca se observaron núcleos celulares con tales características.

En venas estimuladas con TNF- $\alpha$ , se visualizaron células tumorales individuales, o en pequeños agregados –de 2 o más células- haciendo contacto con el endotelio (Fig. 28A). En algunas zonas se llegaron a presentar cambios en la morfología nuclear de algunas células U937, sugiriendo un posible cambio a nivel del cuerpo celular y, con la posible formación de protrusiones citoplásmicas requeridas para la extravasación vascular (Fig. 28B, flecha blanca).

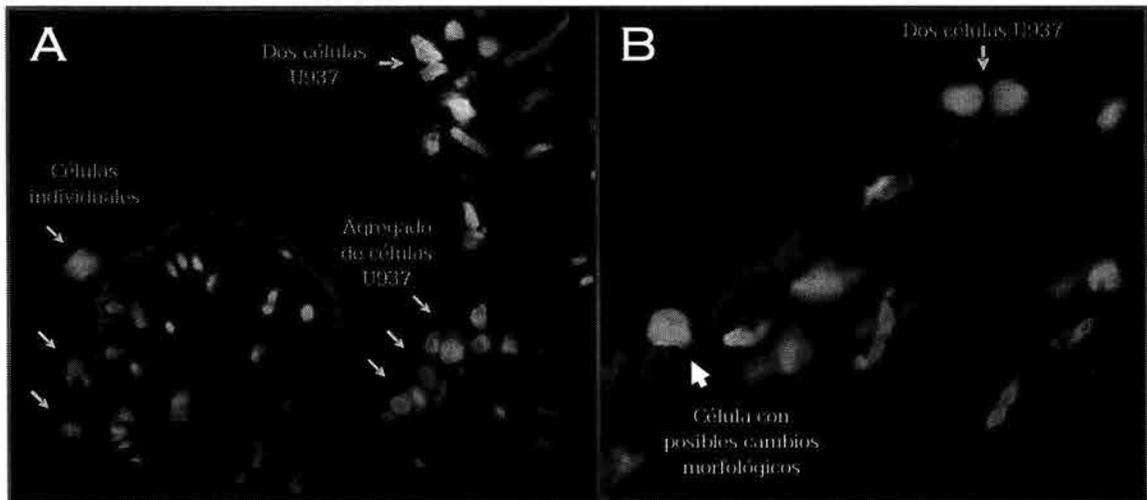


Figura 28 | Inmunofluorescencia de la vena umbilical perfundida con células U937. Las células U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml) se perfundieron por 60 min después de 2 h de haber estimulado al endotelio con TNF- $\alpha$ . Células endoteliales positivas para FVW (fluorescencia roja) en la zona marginal del vaso. Núcleos celulares teñidos en azul con DAPI. A) Se observan células U937 individuales o agregadas sobre el endotelio. B) La flecha blanca sugiere cambios morfológicos en una célula U937. X40.

En una segunda serie de experimentos, se emplearon anticuerpos que reconocieran antígenos para células tumorales U937. En un trabajo previo de nuestro grupo (Montes, 2003), se identificó –por inmunocitoquímica– que la integrina  $\beta 1$  se expresa en células U937 cuando se realizan ensayos de adhesión *in vitro*. Sin embargo, nunca se identificaron dichas integrinas en células en cultivo. Por tanto, buscamos visualizar por inmunofluorescencia la presencia de esta integrina en células U937.

Los resultados indican que las células U937 fueron positivas para la integrina  $\beta 1$  (Fig. 29). La expresión de la integrina  $\beta 1$  se distribuyó ampliamente en la superficie de las células tumorales U937. Al realizar inmunofluorescencia en venas perfundidas, se encontró que no solo la integrina  $\beta 1$  se expresa en las células U937 sino también en las zonas que corresponden a las tunicas media y adventicia del vaso sanguíneo. El endotelio también fue positivo para este antígeno, sin embargo, la intensidad de fluorescencia fue menor a la observada en las otras estructuras de la vena (Fig. 30).

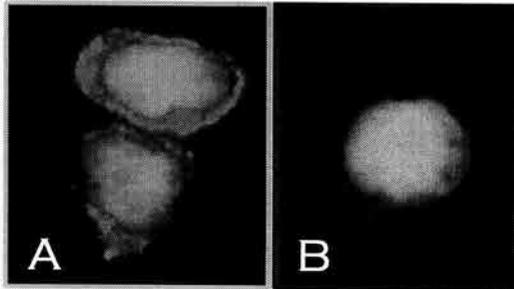


Figura 29 | Distribución de la integrina  $\beta 1$  en la superficie de células U937. U937 fueron marcadas con anticuerpos anti-integrina  $\beta 1$ . Inmuno-reactividad revelada por fluorescencia con anticuerpos secundarios acoplados a: A) FITC; B) rodamina. Núcleos celulares teñidos con DAPI. X100.

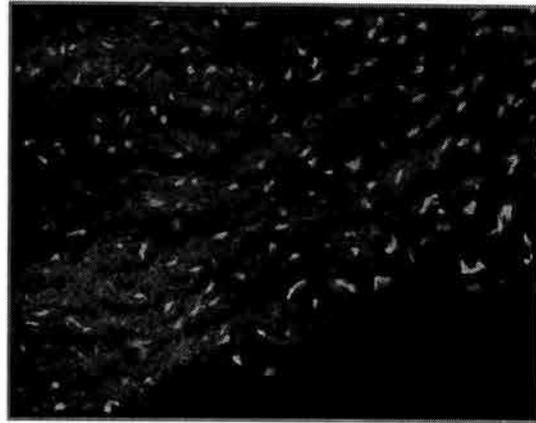


Figura 30 | Expresión de la integrina  $\beta 1$  en las estructuras de la vena umbilical. Inmuno-reactividad revelada por fluorescencia con anticuerpos secundarios acoplados a FITC. Núcleos celulares teñidos con DAPI. X20.

Cuando se perfundieron células tumorales a través de venas pre-tratadas con  $TNF-\alpha$ , tanto el endotelio como las células U937 fueron positivas para la integrina  $\beta 1$  (Fig. 31). Con estos ensayos, se visualizaron contactos estrechos entre las membranas de ambos tipos celulares (adhesión heterotípica) o del mismo tipo celular (interacción homotípica) (Fig. 31B y 31C).

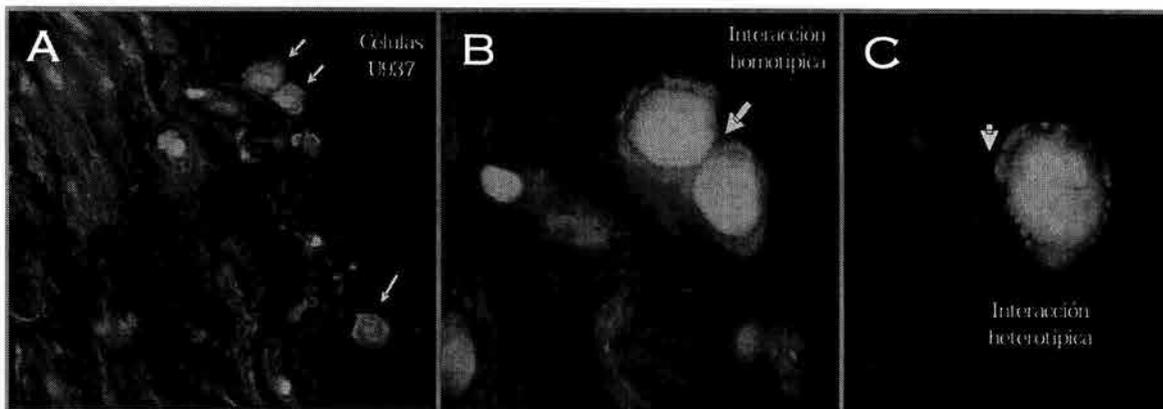


Figura 31 | Expresión de la integrina  $\beta 1$  en células U937 y en el endotelio vascular. Vena umbilical perfundida 2 h con  $TNF-\alpha$  y, posteriormente 1 h con células U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml). A) Se observan células U937 individuales o agregadas sobre el endotelio. X40. B) Dos células U937 interactuando entre sí (adhesión homotípica) y con el endotelio (adhesión heterotípica). X100. C) Interacción heterotípica entre el endotelio vascular y una célula tumoral U937. X100.

Como una característica constante de este trabajo, en cortes seriados se observaron zonas desprovistas de células tumorales mientras que en otras se observaron múltiples células neoplásicas adheridas al endotelio (Fig. 31A).

#### Adhesión de células tumorales a la vasculatura: estudios por microscopía electrónica de barrido

Finalmente, la adhesión de células tumorales circulantes a la vasculatura fue examinada por microscopía electrónica de barrido (SEM).

#### *Morfología de las células tumorales U937*

Previo al estudio de la adhesión, se realizó SEM para observar la morfología de las células tumorales U937. Los resultados indican que la mayoría de las células son esféricas y, unas pocas presentaron cierta asimetría o polarización (Fig. 32). Sin embargo, la principal heterogeneidad fue observada en la superficie de las células. En general se observaron células que exhibieron vesículas (típicas de leucemias megacariocíticas), micro-vellosidades y/o crestas ("ruffles") en su superficie. Mientras que otras presentaron una superficie relativamente lisa (Fig. 32). El diámetro promedio de las células tumorales fue de  $8.6 \pm 0.9 \mu\text{m}$ .

Durante la realización de este trabajo se observó una gran cantidad de células con un número variable de microvellosidades en su superficie, ya que ciertas regiones del cuerpo celular carecieron de microvellosidades (Fig. 32B). Esto último quizás se deba al grado de diferenciación.

Las células des-diferenciadas presentan superficies con pocas microvellosidades. Esto contrasta con observaciones en linfocitos T y B que expresan un número variable de microvellosidades dependiendo de su estado de maduración, grado de estimulación y/o activación (Bhalla *et al.*, 1979). En leucocitos la presentación de estas estructuras es crítica para la formación de contactos estables con el endotelio vascular (von Adrian *et al.*, 1995). Por otra parte, la longitud de las microvellosidades –presentadas por las células tumorales U937– varió desde 0.64 hasta 3.52  $\mu\text{m}$ ; dimensiones comparables a las presentadas por leucocitos (von Adrian *et al.*, 1995).

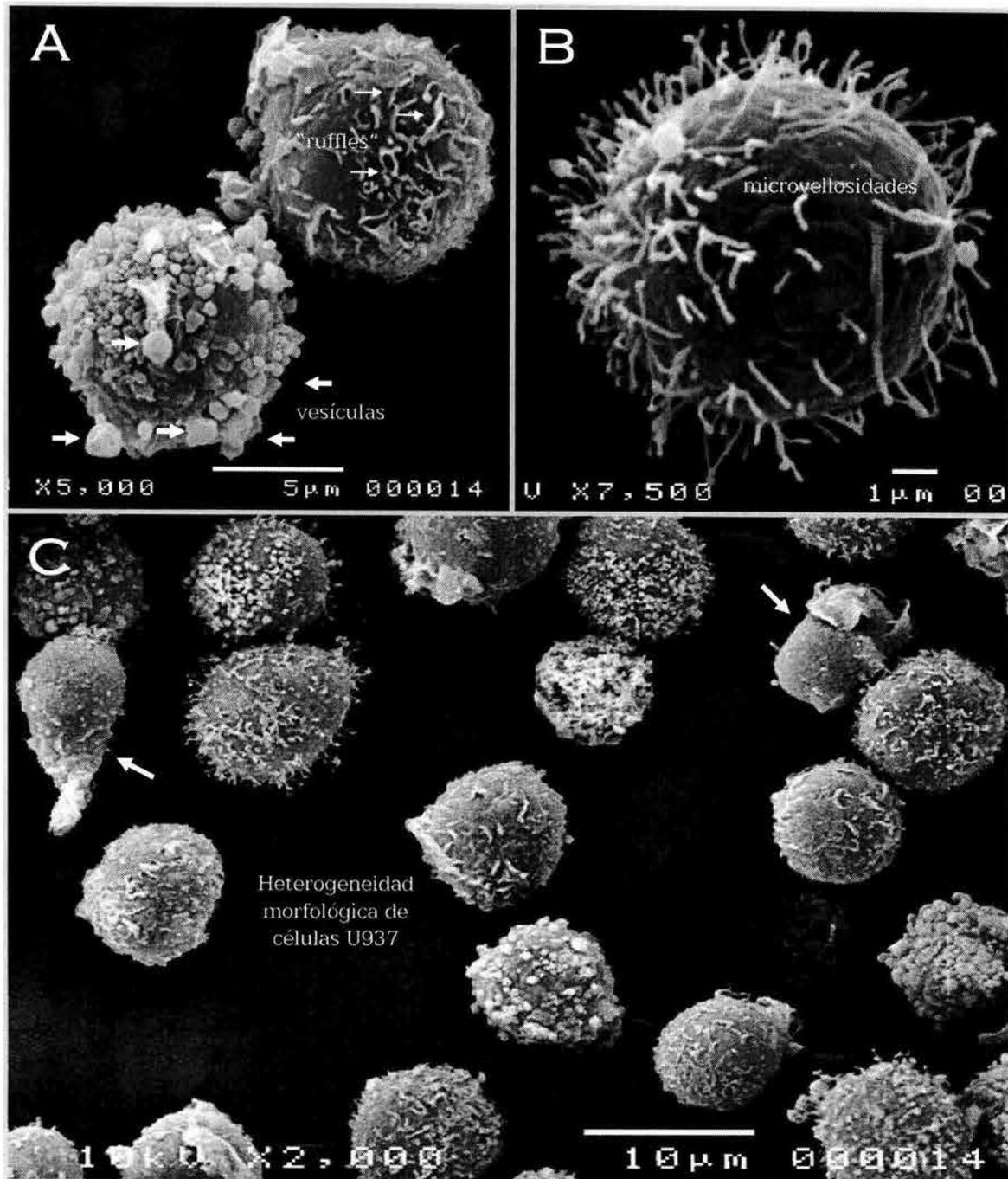


Figura 32 | Heterogeneidad de la superficie de células U937. Cultivo celular asincrónico de 24 h, fijado y procesado para microscopía electrónica de barrido. A) Se muestran dos células representativas con diferentes características superficiales. Las vesículas ocupan la mayor parte del cuerpo celular. B) Célula tumoral que presenta una distribución heterogénea de micro-vellosidades en su superficie. C) Se muestran diferentes morfologías superficiales de células tumorales U937. Las flechas indican dos células con cierta asimetría.

*Visualización de la adhesión célula tumoral-endotelio*

Sesenta min después de la infusión de células tumorales U937 –a la vena umbilical pre-tratada con TNF- $\alpha$ -, se evaluó su adhesión a la cama vascular. La mayoría de las células unidas –individuales o en pequeños agregados (Fig. 33A)- mostraron una forma esférica (Fig. 33B), mientras que otras presentaron una forma aplanada tipo “disco” (Fig. 33C). Este cambio morfológico correlacionó con la disminución de “estructuras” superficiales en la cara luminal de las células tumorales. Interesantemente, al parecer estas células emitieron protrusiones citoplásmicas dirigidas hacia la cama vascular (protrusiones citoplásmicas heterotípicas, PCHt), o haciendo contacto entre ellas (protrusiones citoplásmicas homotípicas, PCHm) (Fig. 33D). Sin embargo, el cambio de una forma esférica a una forma aplanada no fue requisito para que las células U937 emitieran proyecciones hacia la vasculatura, aunque se observó cierta polarización (Fig. 34A y 34B). Las proyecciones citoplásmicas se prolongaron por varias micras sobre la cubierta celular, y al parecer penetraron en ella (Fig. 34C y 34D).

Los cambios mencionados arriba, también son observados durante el proceso inflamatorio, donde los leucocitos sufren cambios morfológicos, pasando de una forma esférica a una forma elongada (Owen and Bhalla, 1983). También, se han observado dos o más linfocitos adheridos al endotelio y haciendo contacto entre ellos por medio de microvellosidades (van Ewijk *et al.*, 1975). Estos resultados sugieren que las células tumorales utilizan mecanismos de adhesión similares, si no idénticos, a los que ocurren en células no-neoplásicas durante procesos fisiológicos tales como el tráfico de células inmunes.

Con frecuencia se observaron agregados de dos o más células en diferentes segmentos de una misma preparación y, en diferentes muestras analizadas (Fig. 33A), implicando que este fenómeno no es un evento “raro” sino más bien “común”. Además, otros autores han reportado observaciones similares con distintas líneas tumorales (Glinskii *et al.*, 2003). Sin embargo, al parecer este fenómeno no solo está restringido a células neoplásicas, ya que también los leucocitos lo presentan (Farr and DeBruyn, 1975; van Ewijk *et al.*, 1975).

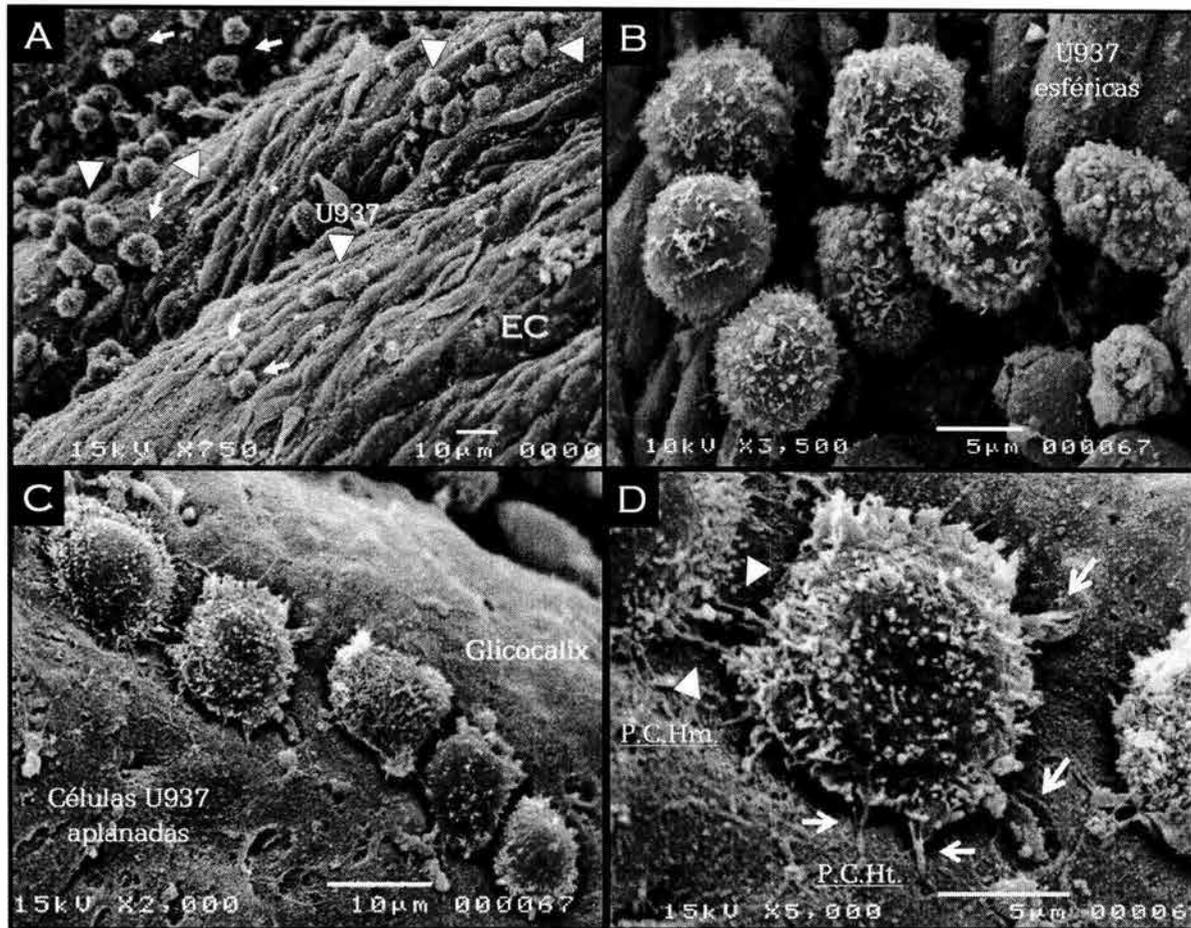


Figura 33 | Adhesión de células tumorales U937 a la vasculatura de la vena umbilical humana perfundida con TNF- $\alpha$  visualizada por microscopía electrónica de barrido. Después de estimular al endotelio por 2 h con TNF- $\alpha$  se perfundieron células U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml) por 1 h más. A) Se observan células endoteliales individuales. En algunas zonas se observa un endotelio desprovisto de células tumorales, mientras que en otras se observan células firmemente adheridas. Las flechas indican células individuales, mientras que las cabezas de las flechas indican pequeños agregados de 2 o más células U937. B) Células U937 con una morfología esférica. Nótese que las células están haciendo contacto entre ellas. Aquí el endotelio presentó una apariencia tipo "cable". C) Cinco células U937 con una morfología aplanada. El endotelio está revestido por el glicocalix. D) Célula U937 haciendo contacto con el endotelio y con otra célula tumoral. Al parecer, su superficie luminal presenta una disminución de estructuras "superficiales". PCHm, proyección citoplásmica homotípica; PCHt, proyección citoplásmica heterotípica.

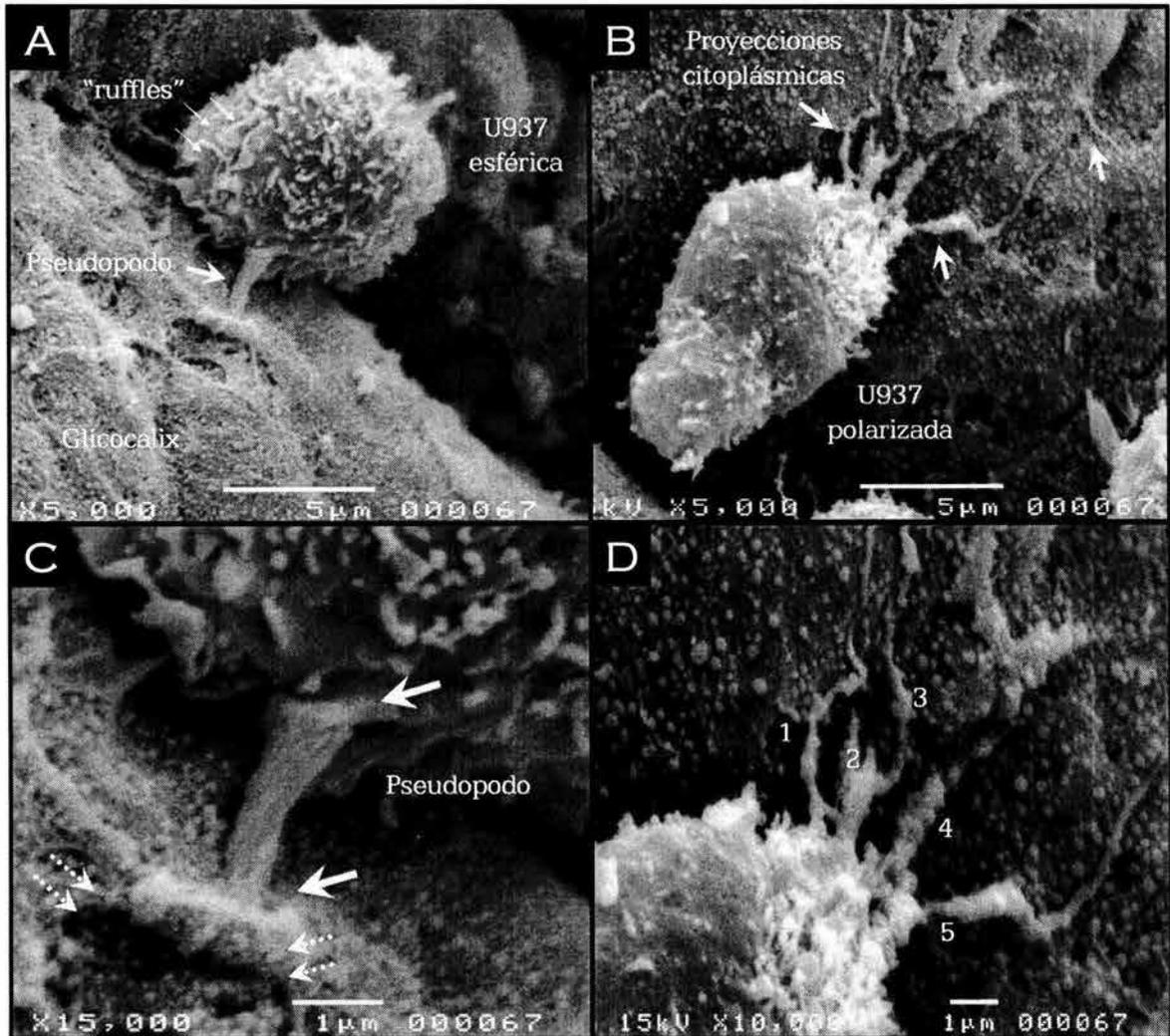


Figura 34 | Adhesión de células tumorales U937 a la vasculatura de venas umbilicales perfundidas con TNF- $\alpha$  visualizada por microscopía electrónica de barrido. Después de estimular al endotelio por 2 h con TNF- $\alpha$  se perfundieron células U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml) por 1 h más. A) Célula U937 esférica con crestas o "ruffles" en su superficie. En su lado basal se observa la emisión de una proyección citoplásmica o pseudópodo que hace contacto con la cubierta molecular; el glicocalix de la vasculatura. B) Célula U937 asimétrica o polarizada. Su superficie es relativamente lisa en el polo donde no se emitieron proyecciones. Las flechas indican varias proyecciones que se prolongan más allá de 5  $\mu\text{m}$ . C) y D) Aumentos de (A) y (B) respectivamente. C) Las flechas punteadas indican un posible desprendimiento o levantamiento del glicocalix en el sitio donde se posiciono el pseudópodo. D) Los números (1-5) indican el número de proyecciones emitidas por la célula tumoral U937. Se aprecia una gran cantidad de gránulos sobre el glicocalix.

Por otro lado, con este tipo de estudios, se observaron células tumorales adheridas en o cerca de las uniones inter-endoteliales (Fig. 35), donde se propone que las células tumorales extravasan hacia el interior del tejido blanco. En ciertas regiones una sola célula tumoral U937 estuvo rodeada por seis células endoteliales (Fig.

35A), mientras que en otras instancias estuvo rodeada de solo tres células endoteliales (Fig. 35B). Sin embargo, nunca se observó retracción del endotelio en las zonas de adhesión.

Asimismo, no se observaron células tumorales posicionadas en el "domo" de células endoteliales individuales, quizá como resultado de disminuir al máximo las fuerzas de rozamiento ocasionadas por el flujo laminar ( $2.2 \text{ dinas/cm}^2$ ).

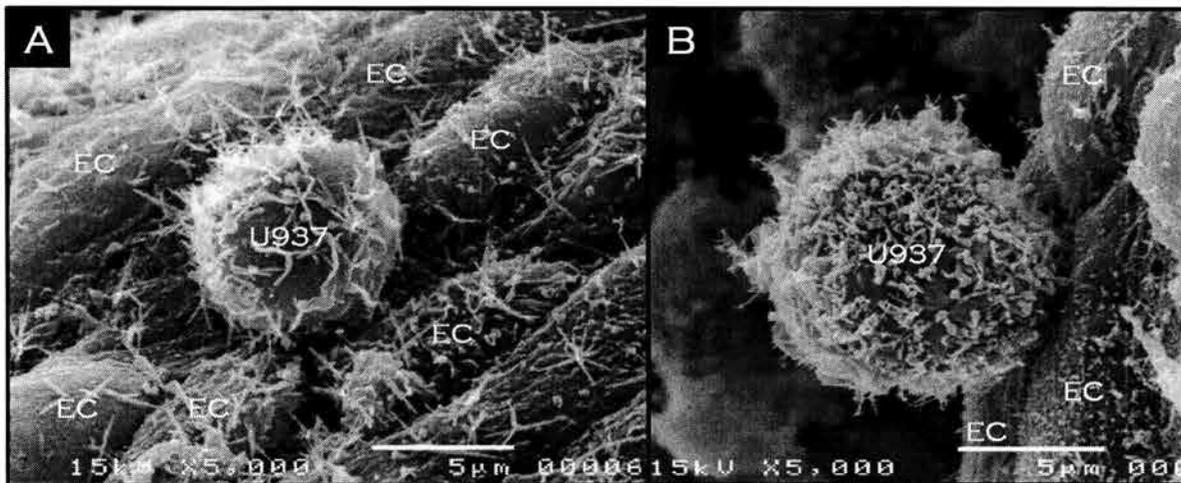


Figura 35 | Adhesión de células tumorales U937 a las uniones inter-endoteliales de la vasculatura visualizada por microscopía electrónica de barrido. Después de estimular al endotelio por 2 h con  $\text{TNF-}\alpha$  se perfundieron células U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml) por 1 h más. A) Se muestra una célula tumoral U937 posicionada en las uniones inter-endoteliales. Dicha célula se encuentra rodeada por seis células endoteliales (EC). B) Otra célula U937 adheridas a la vasculatura. Nótese que las células tumorales nunca se coloraron en el "domo" de las células endoteliales individuales. Ambas células permanecieron esféricas. No se aprecia un glicocalix prominente.

Estudios cuantitativos fueron realizados contando el número de células tumorales U937 por unidad de área ( $1 \text{ u.a.} = 0.2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2$ ). El promedio total de células adheridas al endotelio de venas pre-tratadas con  $\text{TNF-}\alpha$ , fue significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) que el alcanzado en venas perfundidas solo con medio RPMI-1640 (Fig. 36 y Tabla 10). Resultados similares han sido obtenidos con HUVECs estimuladas con citocinas pro-inflamatorias y con diferentes líneas celulares, bajo condiciones de flujo fisiológico (Giavazzi *et al.*, 1993; Tözeren *et al.*, 1995).

Vena perfundida	Número de células U937
Control (RPMI-1640)	5 ± 1
TNF-α	236 ± 63*

Tabla 10 | Número de células tumorales U937 adheridas al endotelio vascular. La vena umbilical fue perfundida con o sin TNF-α (1 ng/ml) durante 2 h, al cabo de las cuales se adicionaron células tumorales U937 (3x10<sup>6</sup> células/ml) durante 1 h. Al final de cada ensayo, las muestras fueron fijadas y procesadas para SEM. Los experimentos fueron realizados con una τ = 2.2±0.2 dinas/cm<sup>2</sup>. El "\*" indica diferencias significativas (P<0.01). Se indican los promedios ± SD de al menos 5 experimentos independientes.

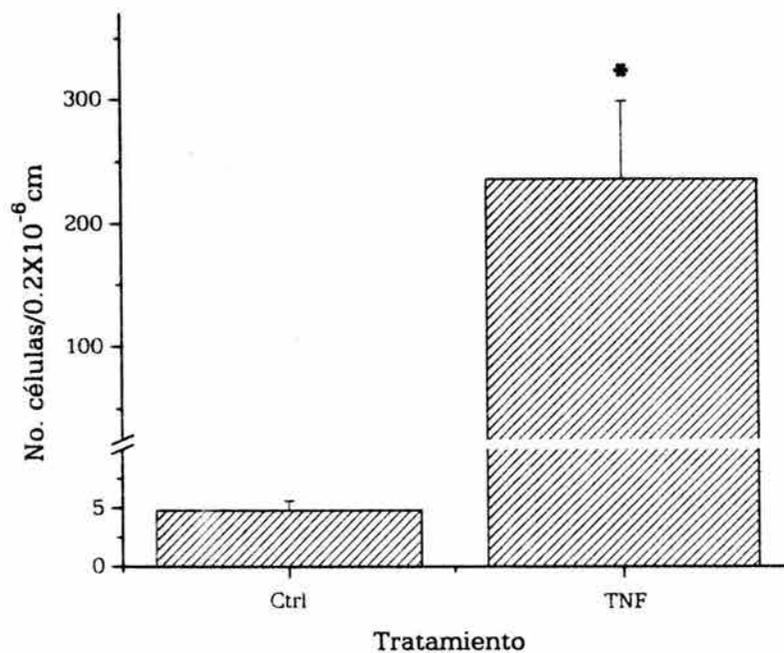


Figura 36 | Número de células tumorales U937 adheridas al endotelio vascular se incrementa en respuesta al tratamiento con TNF. La vena umbilical fue perfundida con o sin TNF-α (1 ng/ml) durante 2 h, al cabo de las cuales se adicionaron células tumorales U937 (3x10<sup>6</sup> células/ml) durante 1 h. Al final de cada ensayo, las muestras fueron fijadas y procesadas para SEM. Los experimentos fueron realizados con una τ = 2.2±0.2 dinas/cm<sup>2</sup>. El "\*" indica diferencias significativas (P<0.01). Se indican los promedios ± SD de al menos 5 experimentos independientes.

En muchas instancias, se observaron múltiples células adherentes localizadas en extensas zonas de la vena umbilical, mientras que el resto del vaso permaneció libre de células neoplásicas. Interesantemente, la mayor densidad se presentó en "depresiones" de la vasculatura y en el endotelio revestido por el glicocalix. Estas

observaciones sugieren la existencia de zonas más propensas dentro de la vasculatura, que presentan una mayor habilidad para albergar células tumorales que otras (Fig. 37) (Glinskii *et al.*, 2003).

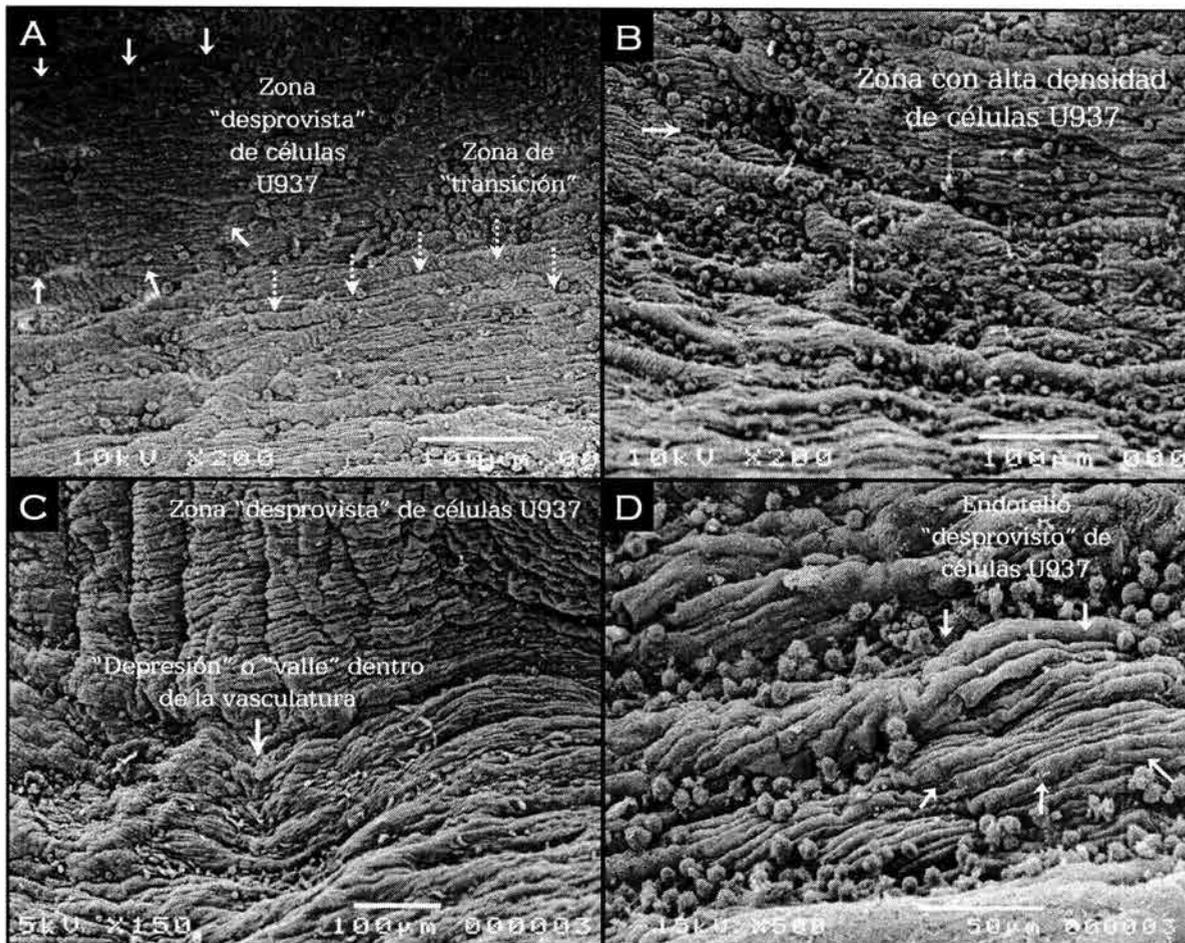


Figura 37 | Heterogeneidad o zonas más propensas ("hot spots") dentro de la vasculatura, que presentan una mayor habilidad para albergar células malignas. La vena umbilical fue perfundida con TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) durante 2 h, al cabo de las cuales se adicionaron células tumorales U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml) durante 1 h. A) Las flechas "punteadas" indican una posible zona de "transición", que presenta un número disminuido de células U937 adheridas a la vasculatura. Las flechas continuas indican el inicio de una región totalmente desprovista de células tumorales. B) Imagen representativa de una zona con "alta densidad" de células adherentes. Se observa la presencia de pequeñas "depressiones" con un número significativo de células adheridas. C) Se aprecia que aún dentro de una misma región, existen zonas desprovistas de células y otras con un gran número de células adheridas. Cabe mencionar que esta alta densidad celular correlaciona con una depresión o valle dentro de la vasculatura. D) Aumento de la región que corresponde a la "depresión" observada en (C). Aún dentro de este "valle" existe una heterogeneidad para albergar células tumorales.

Al parecer todas las células tumorales U937 se arrestaron en la cama vascular mediante adhesión al endotelio y no por restricción de tamaño, ya que las células residieron en un vaso que excede significativamente el tamaño de las células tumorales individuales ( $8.6 \pm 0.9 \mu\text{m}$ ) o en agregados. Esto sugiere –al menos para este modelo– que la adhesión heterotípica al endotelio, más que por restricción de tamaño, se da como resultado de cambios en la superficie apical del endotelio que le permite la interacción y unión firme con las células tumorales U937.

#### **Adhesión y trasmigración de células tumorales a la vasculatura: estudios por microscopía electrónica de transmisión**

Durante los años 1960s y 1970s se llevaron a cabo numerosos estudios sobre el modo de migración de los leucocitos en venulas post-capilares durante la respuesta inflamatoria. Actualmente, se acepta que la trasmigración de linfocitos ocurre entre las uniones intercelulares de las células endoteliales, y no a través de su citoplasma (el punto de vista que prevalecía en ese tiempo; Marchesi and Gowans, 1964).

Por otro lado, en la sección anterior se observó –por SEM– la emisión de protrusiones citoplásmicas, por lo que se llevaron a cabo ensayos de microscopía electrónica de transmisión (TEM), con el propósito de definir el posible inicio de la trasmigración de células tumorales a la vasculatura.

En la figura 38A, se muestran dos células tumorales U937 posicionadas encima del endotelio vascular. Ambas células presentaron una morfología esférica y, no se observó la emisión de proyecciones citoplásmicas hacia la vasculatura.

Con este tipo de estudios se observaron fácilmente las tunicas: íntima y media. Subyacente a la monocapa endotelial y lámina basal, se localizó una lámina elástica interna muy desarrollada. Sin embargo, la lámina basal, los límites interendoteliales, y el glicocalix no fueron identificados fácilmente.

Por otra parte, se observó una célula tumoral migrando a través de la monocapa endotelial. Una gran parte del cuerpo celular de esta célula estuvo en contacto con el endotelio. Interesantemente, se observó la emisión de un pseudópodo, el cual se bifurcó en dos proyecciones de diferente longitud. Una de estas prolongaciones se

extendió más allá de 12  $\mu\text{m}$ , y correlacionó con una disminución en el grosor de la misma (Fig. 38B).

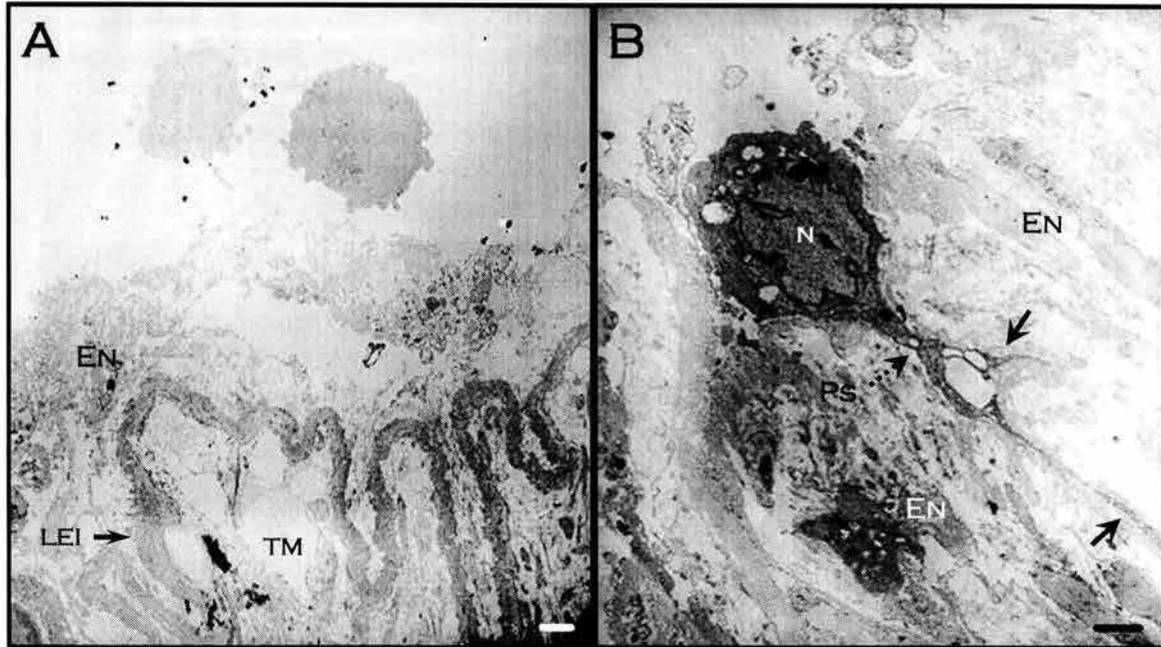


Figura 38 | Adhesión y extravasación visualizadas por microscopía electrónica de transmisión. Segmento de una vena umbilical perfundida con  $\text{TNF-}\alpha$ . Después de estimular al endotelio por 2 h con  $\text{TNF-}\alpha$  se perfundieron células U937 ( $3 \times 10^6$  células/ml) por 1 h más. A) Dos células tumorales U937 posicionadas sobre el endotelio vascular. La lámina elástica interna está muy desarrollada. X2000. B) Una célula tumoral transmigrando la pared vascular. La flecha punteada indica el sitio de bifurcación del pseudópodo, y las flechas continuas indican dos prolongaciones del mismo pseudópodo. Una de estas proyecciones se extendió más allá de 12  $\mu\text{m}$ . X4000. EN, endotelio; LEI, lámina elástica interna; TM, túnica media; Ps, Pseudópodo; N, núcleo celular. Barra = 2  $\mu\text{m}$ .

Además, el diámetro de la célula tumoral se redujo  $\sim 2$   $\mu\text{m}$  en comparación con células adherentes no migrantes (8.6  $\mu\text{m}$ ), y el núcleo celular ocupó una gran parte del cuerpo de la célula ( $\sim 4$   $\mu\text{m}$ ).

Observaciones similares han sido realizadas durante el proceso de trans migración leucocitaria, durante la respuesta inflamatoria. (Estos resultados sugieren que las células tumorales utilizan mecanismos de migración similares, si no idénticos, a los que ocurren en células no-neoplásicas durante procesos fisiológicos tales como el tráfico de células inmunes).

En conjunto, hemos adaptado técnicas de perfusión de órganos para la perfusión de la vena umbilical humana y empleando técnicas físicas para la determinación de parámetros hemodinámicos, técnicas bioquímicas y diversas variantes de microscopía óptica, de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido y de transmisión. Nuestros resultados apuntan a que hemos logrado montar un sistema de perfusión de la vena umbilical humana que:

- presenta una fuerza de rozamiento o "shear stress" similar al fisiológico
- presenta flujo laminar
- elimina rápidamente los coágulos y la sangre residual
- mantienen la viabilidad del endotelio vascular por más de 3 h
- mantiene íntegra la monocapa endotelial
- mantiene un endotelio capaz de producir óxido nítrico en respuesta al TNF- $\alpha$
- permite perfundir suspensiones celulares como las del linfoma humano U937
- permite la adhesión de las células tumorales humanas U937 a la membrana apical de las células del endotelio de la vena umbilical y al glicocalix endotelial cuando este está presente
- permite a las células tumorales U937 la formación de pseudópodos y lamelipódios tanto en la membrana luminal de las células endoteliales cuando se encuentra libre del glicocalix, como sobre el glicocalix endotelial
- permite visualizar procesos de extravasación de las células tumorales U937 a través de la monocapa endotelial

## DISCUSIÓN

En este trabajo describimos un nuevo sistema de perfusión *ex vivo* de vena umbilical humana, el cual permitió observar y estudiar las complejas interacciones entre células tumorales U937 y el endotelio vascular *in situ*, durante el proceso de metástasis tumoral en un contexto más cercano al fisiológico.

La diseminación de las células tumorales se la principal complicación asociada con desordenes malignos, responsables del ~90% de las muertes ocasionadas por tumores en humanos. Dado que las metástasis ocurren de manera interna ha sido difícil estudiar este proceso. Por lo que, es necesario desarrollar modelos que permitan alcanzar un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares que regulan el proceso de la metástasis y de las complejas interacciones entre las células metastásicas y el microambiente del hospedero, con el propósito de desarrollar mejores terapias que limiten y/o prevengan la expansión de células tumorales hacia órganos distantes.

Se ha postulado que uno evento clave en la diseminación metastásica es el arresto de la célula tumoral y su adhesión a la microvasculatura de los órganos blanco. Para estudiar estas interacciones, se han desarrollado diferentes aproximaciones *in vitro* e *in vivo*. Los primeros experimentos que demostraron la adhesión de células tumorales al endotelio vascular, fueron realizados en sistemas de cultivo estáticos (Kramer and Nicolson, 1979). No obstante, una explicación completa de los mecanismos que median las interacciones entre células tumorales y endoteliales debe considerar las fuerzas físicas asociadas al flujo sanguíneo, por ejemplo, la fuerza de fricción o "shear stress", o la forma parabólica del flujo laminar que ocurre dentro de la vasculatura. Desafortunadamente, los ensayos de adhesión en condiciones estáticas no consideran estos fenómenos, y miden la adhesión celular como un solo evento, en vez de analizarlo como una consecución de etapas. Con modelos de cámaras de flujo o vasos sanguíneos artificiales, que reproducen condiciones hemodinámicas sanguíneas, sugieren que las interacciones entre las células tumorales y el endotelio involucran un rodamiento o "rolling" como el que median las selectinas y adhesión dependiente de integrinas bajo condiciones de

flujo (Giavazzi *et al.*, 1993; Patton *et al.*, 1993; Brenner *et al.*, 1995; Simiantonaki *et al.*, 2002; Pu *et al.*, 2002). Si bien los cultivos de monocapas de células endoteliales constituyen un modelo experimental práctico, este carece de diversos aspectos estructurales de los vasos *in vivo*. El fenotipo endotelial definido en cultivos *in vitro* difiere del que se tiene *in vivo* (Augustin *et al.*, 1994), al menos en tres aspectos: (i) En cultivo, las células endoteliales están constantemente estimuladas por factores y mitógenos del suero impulsando su proliferación, contrario al estado quiescente *in vivo* en el que se encuentran. (ii) En cultivo, las células endoteliales no están expuestas a la fuerza de rozamiento (o "shear stress"), capaz de regular la expresión génica (Gimbrone, 1997; Chen *et al.*, 2001; McCormick *et al.*, 2001) y (iii) *In vivo*, las células endoteliales forman un sincicio funcional apoyado sobre su lámina basal y otros componentes de matriz extracelular, con interacciones con células del músculo liso. Indudablemente, todas estas características podrían contribuir a la función endotelial *in vivo*. De hecho, se ha demostrado que en ausencia de una lámina basal, se afectan diferentes funciones. Por ejemplo, las células epiteliales de mama, expresan muy poca o nada de proteínas de leche aún cuando se cultivan con hormonas lactogénicas como la hidrocortisona y prolactina (Streuli and Bissell, 1990; Streuli *et al.*, 1991). También se ha reportado que *in vitro*, la composición de la lámina basal (laminina, colágena tipo IV, entactina y proteoglicanos de tipo heparan sulfato) difiere de la encontrada *in vivo* (Streuli and Bissell, 1990). Con el fin de superar las limitaciones de los sistemas de cultivo, en los últimos años se han desarrollado sistemas de estudio *in vivo*, empleando animales inmunodeficientes o singénicos y aplicando técnicas de microscopía intravital, para la formación de metástasis en diferentes órganos (Chambers *et al.*, 1995; Paris *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; 2002). No obstante, por limitaciones técnicas estos sistemas proporcionan información molecular limitada de las moléculas de adhesión intercelular relevantes en la metástasis.

Por tal motivo, diferentes grupos han perfundido algunos vasos humanos, como vena safena, venas y arterias umbilicales, y cotiledones de placentas en término. En la mayoría de estos estudios se han estudiado los efectos de la fuerza de rozamiento o "shear stress" sobre la función endotelial, la adhesión de leucocitos al endotelio, o problemas cardiovasculares, tales como, aterosclerosis, preclampsia y

el origen de venas varicosas (Akar *et al.*, 1994; Wieczorek *et al.*, 1995; Bougelet *et al.*, 1998; Gan *et al.*, 1999, 2000a, 2000b; Doroudi *et al.*, 2000; Georgiou *et al.*, 2001; Crowley *et al.*, 2002). Sin embargo, ningún grupo ha estudiado las interacciones entre células tumorales y el endotelio vascular utilizando modelos de venas humanas.

En el presente trabajo se analizaron las interacciones de células tumorales U937 con el endotelio vascular usando un nuevo modelo *ex vivo* de vena umbilical humana perfundida. El uso de este tejido humano presenta ventajas sobre otros modelos, ya que (i) es un vaso diferenciado que presenta características similares – si no idénticas- a las de la micro-vascular donde ocurre la adhesión de células metastásicas; (ii) se reproduce el comportamiento laminar del flujo, y los niveles de la fuerza de rozamiento o “shear stress” encontrados en vénulas post-capilares; (iii) la integridad membranal y estructural de la monocapa endotelial, y algunas de sus propiedades funcionales no se encuentran alteradas; (iv) funciona como modelo para estudiar los procesos de adhesión que ocurren durante la metástasis; y (v) permite estudiar las moléculas que participan en la interacción entre células tumorales humanas U937 y el endotelio vascular *in situ*.

#### **ELECCIÓN DEL MEDIO RPMI-1 640 COMO SOLUCIÓN DE PERFUSIÓN**

La elección de un medio de perfusión es un factor crítico durante el montaje y desarrollo de un sistema de perfusión, y depende de numerosas variables. Por ejemplo, las investigaciones que están interesadas en funciones metabólicas “intracelulares” emplean medios basados en mezclas de glutamato (o aspartato) de potasio y sacarosa (o taurina), que se asemejan al interior de la célula, mientras que las interesadas en electrofisiología utilizan soluciones basadas en fluoruros, principalmente fluoruro de cesio, ya que el cesio reduce la conductancia del potasio (Baker, 1984).

Por el contrario, en diferentes preparaciones de “órganos aislados” perfundidos, se emplean soluciones fisiológicas salinas, sangre completa o fluidos basados en plasma. Sin embargo, con este último fluido no se han obtenido resultados consistentes (Linask *et al.*, 1978). El uso de sangre completa ocasiona múltiples complicaciones en el curso de los experimentos, tales como agregación de

eritrocitos, precipitación de proteínas, y la formación de espuma y coágulos (Döring and Dehnert, 1986). El medio de perfusión comúnmente empleado en diferentes preparaciones perfundidas –cardíacas, hepáticas, cerebrales y de la glándula adrenal- es la solución salina de Krebs-Ringer (compuesta por sales inorgánicas) (Tabla 11) (Mortimore, 1961; Papaikonomou, 1977; Sibley and Whitehosue, 1979; Döring and Dehnert, 1988; Mehvar and Zhang, 2002).

En los años 1960s y 1970s, se vio la necesidad de formular soluciones más complejas si los ensayos de perfusión duraban más de 60 min, ya que la actividad de ciertos órganos y/o tejidos disminuía (por ejemplo, la fuerza contráctil del corazón). Estas soluciones (por ejemplo, CMRL-1415) contenían –a parte de las sales usuales- aminoácidos, coenzimas, piruvato y otros componentes (Linask *et al.*, 1978). Sin embargo, de acuerdo con Döring y Dehnert (1986), el empleo de tales soluciones no son requeridas para estudios de perfusión que duren  $\leq 1$  h.

Ya que el tiempo óptimo de los ensayos de adhesión *in vitro* (mediante sedimentación por centrifugación) es de 3 h para alcanzar el máximo de adhesión nos propusimos mantener la preparación en condiciones funcionales por el mismo tiempo (Fig. 13). Este período supera por mucho el tiempo sugerido por Döring y Dehnert (1986). Debido a estos antecedentes, y ya que la presencia de cationes divalentes podrían ser necesarios para el mantenimiento de las interacciones entre células tumorales y el endotelio vascular, probamos diferentes medios de cultivo – que son más complejos que la solución salina Krebs-Ringer-, para definir si estos favorecían al ensayo de adhesión.

Los resultados obtenidos indicaron que la adhesión heterotípica entre células tumorales U937 y células endoteliales –activadas por el TNF- $\alpha$ -, se ve incrementada de manera significativa en presencia de medio RPMI-1640 con respecto a los demás medios empleados (DMEM, M199, MEM y, Krebs-Ringer) (Fig. 7), ya que presentó el mayor porcentaje de adhesión ( $\sim 60\%$ ).

Aunque es difícil de explicar las bases de las diferencias (mayor adhesión en presencia de RPMI-1640), podemos plantear varias alternativas. La naturaleza de las células endoteliales y que provienen de diferentes cordones umbilicales puede contribuir a este hecho. Por esta razón en todos los ensayos se mezclaron células de diferentes cordones umbilicales. Además, en un estudio previo de laboratorio se

observo que el porcentaje de adhesión no cambia aún si se emplean células endoteliales derivadas de un solo cordón (Montes, 2003). Otra posibilidad es la contribución de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) a las uniones intercelulares. Las interacciones de integrinas y selectinas con sus respectivos ligandos, son un proceso dependiente de cationes, que ocurre con afinidades relativamente bajas ( $10^{-6}$  M) (Edelman *et al.*, 1995). Las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en el medio RPMI-1640 son 2.3 veces mayores que las encontradas en los demás medios de cultivo (DMEM, M199 y MEM), y 3.3 en la solución salina Krebs-Ringer.

Composición de medios (mM)					
	RPMI-1640	DMEM	M199	MEM	Krebs-Ringer
NaCl	100.1	109.51	116.35	116.35	124.91
KCl	6.84	5.36	6.84	5.36	4.75
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	----	----	----	----	1.2
$\text{MgSO}_4$	0.405	0.813	0.813	0.813	1.2
$\text{NaHCO}_3$	23.8	44.04	28.56	28.56	24.0
$\text{CaCl}_2$	---- *	1.8	1.8	1.8	1.27
D-glucosa	11.09	24.97	5.5	5.5	5.0

Tabla 11 | Composición de diferentes medios de cultivo. Se indican las concentraciones de diferentes sales inorgánicas. \* El medio RPMI-1640 contiene  $\text{Ca}^{2+}$  en forma de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (4.23 mM).

Además, estudios *in vitro* indican que modificando las concentraciones de cationes se obtienen cambios en la afinidad de ciertos receptores para integrinas (Gailit and Ruoslahti, 1988). Esta última evidencia sugiere que la pequeña diferencia en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , pudiera haber contribuido a una mayor adhesión entre células tumorales U937 y células endoteliales en presencia de medio RPMI-1640 bajo condiciones de cultivo.

#### ELIMINACIÓN DE LOS CONTENIDOS ENDÓGENOS DE LA VENA: POSIBLES ELEMENTOS CONTAMINANTES

En la mayoría de los modelos de perfusión la eliminación de los restos sanguíneos, es importante para que los resultados no se alteren por liberación accidental de

estos componentes (Al-Mehdi *et al.*, 2000; Glinskii *et al.*, 2003; Babbs, 1994). En pulmones de rata perfundidos, por ejemplo, se requiere un volumen ~100 ml para que lleguen a estar libres de sangre, que va acompañado de un cambio de color del órgano de rojo a un tono blanquecino (Babbs, 1994). A diferencia de otros modelos de perfusión, en estudios de vasos sanguíneos humanos (por ejemplo, vena umbilical), no mencionan el volumen ni el tiempo requerido para eliminar coágulos y restos sanguíneos (Bougelet *et al.*, 1998; Gan *et al.*, 1999). Por tanto, una de nuestras primeras tareas fue definir el tiempo y volumen de lavado necesarios para eliminar los componentes endógenos de la vena umbilical.

Los resultados indicaron una gran variación de los contenidos endógenos de la vena, lo que sugiere una gran variación de la cantidad de contaminación entre las diferentes venas umbilicales (Fig. 10). Sin embargo, después de 10 min de lavado y utilizando ~10 ml de medio RPMI-1640 libre de suero, los restos sanguíneos de las venas fueron eliminados casi en su totalidad. Lo anterior fue confirmado mediante estudios por microscopía electrónica de barrido, que demostró que después de lavado la vena umbilical se encontraba desprovista de coágulos y restos sanguíneos (Fig. 12).

En respuesta a ¿cuáles podrían ser los posibles candidatos que pudieran estar absorbiendo a las longitudes de onda detectadas (270, 410 y 558 nm) en el líquido de lavado?, podemos proponer lo siguiente. La hemoglobina –contenida en los eritrocitos– es seguramente un contaminante de la vena umbilical. Tanto su estado de oxidación, como la presencia o ausencia de oxígeno molecular, se traducen en cambios en su espectro en la zona del visible, la zona característica de su grupo prostético, el grupo hemo. En la figura 39, se muestra el espectro de absorción de las hemoglobinas oxigenada y desoxigenada. Como se puede observar, la oxihemoglobina (o hemoglobina oxigenada) presenta dos picos de absorción: uno a 540 nm y otro a ~575 nm; mientras que la desoxihemoglobina (o hemoglobina desoxigenada) absorbe muy cerca de los 558 nm.

Los grupos hemo de los citocromos reducidos [Fe(II)] tienen espectros detectables de absorción visible, que constan de tres picos: las bandas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Voet and Voet,

1995). La longitud de onda del pico  $\alpha$ , es útil para diferenciar los distintos citocromos (Fig. 40).

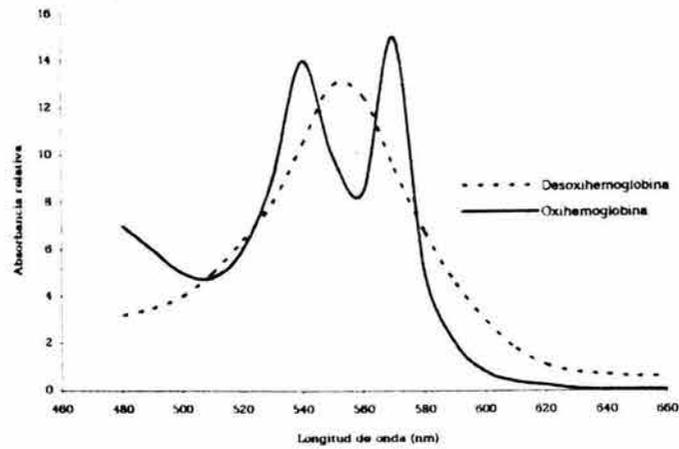


Figura 39 | Espectros de absorción de oxi- y desoxihemoglobina. Ambas corresponden a los diferentes estados de oxigenación de la variante reducida ( $Fe^{2+}$ ). Tomado de Voet and Voet (1995).

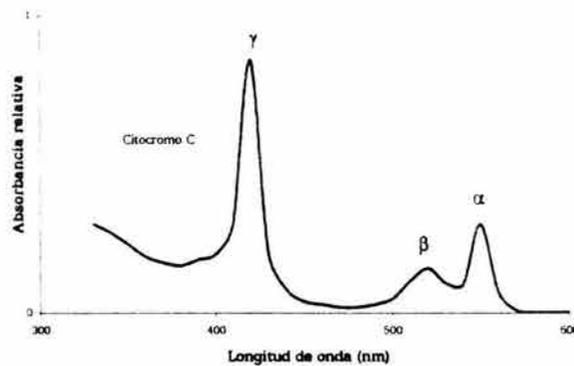


Figura 40 | Espectro de absorción visible del citocromo c reducido que muestra sus bandas de absorción características  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ . Tomado de Voet and Voet (1995).

	$\gamma$	$\beta$	$\alpha$
Citocromo a	439		600
Citocromo b	429	532	563
Citocromo c	<u>415</u>	521	550
Citocromo $c_1$	<u>418</u>	524	<u>554</u>

Tabla 12 | Absorbancia máxima de los citocromos a, b, c, y  $c_1$ . Tomado de Voet and Voet (1995).

Como se indica en la tabla 12, los citocromos  $c\gamma$ ,  $c_1\alpha$  y  $c_1\gamma$ , (subrayados y en negritas), absorben a longitudes de onda muy cercanas a las registradas en el eluido de la vena umbilical.

Por otro lado, las transaminasas, constituyen un grupo muy importante de enzimas de escape. En este caso el grupo prostético es la vitamina B6, en sus dos versiones, tanto en su forma de fosfato de piridoxal (PLP), como de fosfato de piridoxina (PMP). La primera de ellas es de un color amarillo muy intenso, lo que se traduce en la presencia de bandas de absorción centradas sobre los 360 y 420 nm. La segunda especie enzimática, la que contiene PMP, solo absorbe a los 330 nm (Voet and Voet, 1995).

Por lo tanto, en base a esta evidencia –aunque obviamente se necesitan más estudios–, se pueden proponer a estas proteínas y a la hemoglobina –presentes en el interior de las células– como los posibles elementos que absorben a las longitudes de onda registradas en el eluido de la vena umbilical. Es muy probable que la mayor parte de la absorbancia registrada a 558 nm se deba principalmente a la hemoglobina, y no a los citocromos, ya que la cantidad de hemoglobina presente en sangre completa es ~150 mg/ml. Sin embargo, esto no explica la absorbancia registrada a 410 nm. Es probable que lo que estamos observando sea el efecto sinérgico de los citocromos  $c\gamma$ ,  $c_1\gamma$ , y PLP –u otras moléculas–, ya que ambos citocromos y la transaminasa absorben a longitudes de onda muy cercanas entre sí. Como era de esperarse se registró un pico de absorbancia alrededor de los 270 nm, ya que tanto las proteínas como los ácidos nucleicos absorben principalmente entorno a los 260-290 nm. La característica más significativa de las proteínas es una banda de absorción centrada sobre los 280 nm debida a los residuos de fenilalanina, tirosina y triptófano, donde este último es el residuo que presenta mayor coeficiente de extinción, y el que contribuye más a la absorción a 280 nm.

Por el contrario, las bases nitrogenadas, adenina y guanina, absorben alrededor de los 260 y 280 nm, respectivamente. Sin embargo, la formación del enlace C-N entre el anillo de la ribosa/desoxirribosa y las bases nitrogenadas (nucleósido) distorsionan la distribución electrónica de éstas, y altera ligeramente sus espectros de absorción. Como resultado de ello, la característica más significativa de los

---

ácidos nucleicos es una banda de absorción centrada sobre los 260 nm (Voet and Voet, 1995).

#### **LA PERFUSIÓN NO ALTERA LA INTEGRIDAD MEMBRANAL Y ARQUITECTURA ENDOTELIAL *IN SITU***

Una de las principales técnicas que valora la funcionalidad de la membrana es la que utiliza yoduro de propidio (IP) y diacetato de diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA), bajo condiciones de microscopia de fluorescencia. El IP es un fluorocromo que se intercala entre las bases del DNA incrementando sensiblemente su fluorescencia cuando se excita a 480 nm. La membrana de células viables no permite su paso al interior del citoplasma, de manera que únicamente se teñirán núcleos de células no viables que tengan alterada y/o dañada su membrana celular (células muertas) (Sauch *et al.*, 1991; Suematsu *et al.*, 1991). Por el contrario, el H<sub>2</sub>DCFDA es un componente que puede difundir hacia el interior de las células, donde es hidrolizado por esterasas intracelulares. El componente resultante, diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF), puede ser oxidado por hidroperóxidos orgánicos e inorgánicos para producir H<sub>2</sub>DCF fluorescente, cuando se excita a 488 nm. De manera que, con esta técnica, únicamente se teñirán células viables y funcionales con un citoplasma en color verde (Suematsu *et al.*, 1991; LeBel *et al.*, 1992; Royal and Ischiropoulos, 1993).

En el presente estudio, cuando se emplearon ambas tinciones antes y después de las sesiones de perfusión, solo se visualizaron células funcionales con un citoplasma verde frente a la ausencia de células muertas con un núcleo rojo (Fig. 14 y 15). Estos resultados sugieren que las condiciones de perfusión utilizadas en este trabajo, no ocasionaron alteraciones en la integridad estructural de la membrana endotelial.

El H<sub>2</sub>DCFDA ha sido utilizado ampliamente en estudios de estrés oxidativo, ya que la intensidad de su fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de especies reactivas de oxígeno presentes en el interior de las células (LeBel *et al.*, 1992). No obstante, aquí solo se empleo como una herramienta para evidenciar células viables con una membrana integra.

Es interesante mencionar que existe evidencia que indica que la adhesión y migración de leucocitos al endotelio provoca un incremento en los niveles de estrés oxidativo (Suematsu *et al.* 1993; Anasagasti *et al.* 1996). Por tanto, en nuestro modelo se podría comprobar si la adhesión de células tumorales U937 al endotelio vascular, ocasiona un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno.

Interesantemente, se ha reportado que la exposición de células endoteliales a niveles submilimolares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o hidropéroxidos lipídicos conduce a la expresión de moléculas de adhesión (Lewis *et al.*, 1988; Gasic *et al.*, 1991; Patel *et al.*, 1991). Anasagasti *et al.* (1997) observaron que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promueve la adhesión de células de melanoma B16 al endotelio por un mecanismo dependiente de VCAM-1/VLA-4 (integrina  $\alpha 4\beta 1$ ). Además, se ha demostrado que ciertas líneas tumorales (por ejemplo, Walter 256) producen especies reactivas de oxígeno (Szatrowski and Nathan, 1991; Soares *et al.*, 1994; Shaughnessy *et al.*, 1989; Offner *et al.*, 1996). La muerte endotelial por estrés oxidativo durante la diseminación metastásica dejaría expuesta la lámina basal de los vasos sanguíneos y facilitar la invasión. Cabe restar que en general, los componentes de ECM sub-endotelial parecen ser un mejor sustrato para la adhesión de muchas células tumorales que la superficie apical de las células endoteliales (Kramer *et al.*, 1980; Haier *et al.*, 1999).

La actividad de LDH corrobora los datos obtenidos mediante el uso de tinciones vitales. La perfusión *per se* de la vena umbilical durante 3 h, no altera significativamente la integridad de la membrana endotelial, ya que los porcentajes de actividad de LDH, presentes en el medio de cultivo y de perfusión fueron comparables (Tabla 6).

Con respecto a las células tumorales, existen controversias acerca de los efectos que ejercen sobre ellas las fuerzas hemodinámicas. Mientras algunos autores reportan una viabilidad mayor al 80% de células de melanoma B16 inyectadas a la circulación de animales inmunodeficientes o singénicos (Morris *et al.*, 1993; Chamber *et al.*, 1995; Koop *et al.*, 1995), otros, reportan que el 70% de las mismas células son destruidas dentro de la primera hora al estar sometidas a la fuerza de rozamiento o "shear stress" (Brooks, 1984). En el presente trabajo encontramos que el 34% de las células del linfoma humano U937 parecen ser afectadas por las

condiciones de perfusión y/o recirculación (flujo y "shear stress" de 900  $\mu\text{l}/\text{min}$  y 2.2  $\text{dinas}/\text{cm}^2$ , respectivamente). Interesantemente, más del 90% de estas células sobrevivo bajo condiciones de cultivo, y retuvo su capacidad de adhesión a células endoteliales (Fig. 29). La pérdida de viabilidad celular bajo flujo podrían deberse a: (i) un daño mecánico a la membrana celular por las fuerzas de rozamiento; (ii) daño mediado por el metabolismo de oxígeno; (iii) un trauma mecánico asociado a la deformación celular; y/o (iv) a variaciones en la presión (Weiss, 1989; Barbera-Guillem and Weiss, 1993; Albertsson *et al.*, 1995).

#### **Integridad de la Monocapa Endotelial: Estudios Morfológicos**

Una meta importante al desarrollar este sistemas de perfusión *ex vivo*, fue la preservación de la integridad del recubrimiento endotelial.

En algunos modelos de perfusión *ex vivo* donde se ha reportado la presencia de una túnica media intacta, la superficie íntima se encontró desprovista de células endoteliales (Mangiarua *et al.*, 1992). Además, en algunas preparaciones la formación de edema parece ser acompañada por una contracción radial y/o longitudinal del endotelio (las células endoteliales presentan una forma tipo "gota") (Mohammad, 1995). En el presente estudio, no se observaron tales características y el aspecto estructural de las células endoteliales perfundidas fue semejante al encontrado en fragmentos de vena no perfundida de la misma vena (Fig. 18, 19 y 20). Estos datos sugieren que aún después de 3 h de perfusión, las células endoteliales continúan formando una monocapa continúa e integra.

#### **EL ENDOTELIO VASCULAR PERFUNDIDO RESPONDE A LA ESTIMULACIÓN POR FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ )**

Además de analizar la integridad de la monocapa endotelial, se evaluó si el endotelio perfundido respondía a estímulos externos, como el del TNF- $\alpha$ , que induce –entre otros efectos- la producción de óxido nítrico mediante la activación de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) (Beck *et al.*, 1999).

El óxido nítrico (NO) es un radical libre no cargado con un electrón no apareado compuesto por un átomo de nitrógeno y otro de oxígeno, altamente reactiva con

compuestos biológicos reducidos, que difunde libremente a través de las bicapas lipídicas de las membranas biológicas (Ignarro *et al.*, 1999). El NO posee una vida media corta (3-5 seg), después de la cual se degrada a compuestos de desecho como nitratos y nitritos, por lo que el mejor índice de la producción celular de NO es total es la suma de ambos productos (de Assis *et al.*, 2002).

El NO es sintetizado por una familia de enzimas denominadas sintetasas de óxido nítrico (NOS), que catalizan la reacción del oxígeno molecular con el aminoácido L-arginina para producir NO y L-citrulina. Las células endoteliales presentan dos isoformas de la NOS: la constitutiva (eNOS), que es calcio-dependiente, cuya función es producir NO que regula el tono vascular basal, y la forma inducible o iNOS, cuya actividad depende de  $Ca^{2+}$  y cuya expresión depende de citocinas pro-inflamatorias, como el TNF- $\alpha$  (Ignarro *et al.*, 1999).

Cuando las venas umbilicales fueron perfundidas con TNF- $\alpha$ , y se cuantificó la concentración de nitratos/nitritos en el medio de perfusión encontramos un incremento significativo (69%;  $P < 0.05$ ) respecto a venas perfundidas solo con medio RPMI-1640 (Tabla 8). Resultados similares fueron obtenidos en el medio de HUVECs *in vitro*. La producción basal de nitratos/nitritos *in situ* e *in vitro*, sugieren que la isoforma constitutiva (eNOS) se encuentra activa, y los resultados en presencia de TNF- $\alpha$  que la isoforma inducible (iNOS) se activa.

La concentración basal de nitratos/nitritos de venas perfundidas fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) a la detectada en cultivo (más del 200%) (Tabla 8). Se sabe que la fuerza de fricción o "shear stress", generado por el flujo laminar estimula la producción de NO a través de la activación de la eNOS por un mecanismo independiente de  $Ca^{2+}$ . Al parecer, la fosforilación de la eNOS en los residuos de Ser<sup>635</sup> y Ser<sup>1179</sup> en forma dependiente de la cinasa de proteínas tipo A (PKA) juega un papel muy importante en la regulación de la activación de la enzima en respuesta al "shear stress" (Boo *et al.* 2000a; 2000b).

Por tanto proponemos que la concentración basal de nitratos/nitritos en el medio de venas perfundidas, en ausencia de TNF- $\alpha$ , se debe a la activación de la eNOS por la fuerza de rozamiento o "shear stress", mientras que en presencia de TNF- $\alpha$ , la concentración de nitratos/nitritos resulta de la suma de la contribución de NO

producido por la eNOS y la iNOS. Wieczorek *et al.* (1995), reportaron resultados similares en cotiledones de placentas humanas profundidas *ex vivo*.

Estos datos sugieren que el endotelio vascular profundido responde tanto a estímulos fisiológicos ("shear stress") como externos (TNF- $\alpha$ ).

### VISCOSIDAD: REPERCUSIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS

La viscosidad de la sangre es un elemento de gran importancia en el flujo hemodinámico, ya que relaciona la cinemática del movimiento de un fluido con las fuerzas hidrodinámicas, que son experimentadas por objetos que están en contacto con el fluido. Por tanto la viscosidad del líquido de perfusión es de gran importancia en el desarrollo y uso de modelos hidrodinámicos ya que además, afecta la función endotelial (Pries *et al.*, 1992).

La viscosidad sanguínea y plasmática son dos parámetros que caracterizan las propiedades del flujo sanguíneo. La viscosidad plasmática depende de la concentración de proteínas del plasma, principalmente, de macromoléculas como el fibrinógeno, que juega un papel más importante que las inmunoglobulinas, lipoproteínas o incluso que la albúmina. A la viscosidad sanguínea contribuyen la viscosidad plasmática, la densidad de los componentes celulares (hematocrito) y las deformaciones y agregaciones de glóbulos rojos (Chien, 1987; Alonso *et al.*, 1995). La agregación de eritrocitos es dependiente del fibrinógeno que forma un puente entre las membranas de los eritrocitos (Alonso *et al.*, 1993; 1995).

Cabe mencionar que el flujo sanguíneo es no-Newtoniano, es decir, la viscosidad de la sangre varía en función de la velocidad de flujo y del "shear rate". El incremento en la viscosidad sanguínea a bajo "shear rate" se atribuye a la formación de los agregados eritrocitarios y al incremento asociado del "volumen efectivo de partículas" (Alonso *et al.*, 1993).

En el presente trabajo, la viscosidad del medio RPMI-1640 (+10 % ST) a 37°C fue de 0.745 cP, valores comparables a los obtenidos por otros autores (Taylor *et al.*, 1996; Rinker *et al.*, 2001). Cuando la viscosidad del medio se determinó en presencia de células tumorales U937, sus valores se incrementaron de manera significativa en un 21.2% (0.903 cP). En contraste, Giavazzi *et al.* (1993) obtuvieron valores de 0.8 cP en presencia de células. Esta discrepancia pueden atribuirse a

una diferencia en las densidades celulares:  $1 \times 10^6$  células/ml contra  $3 \times 10^6$  células/ml empladas por ellos y nosotros respectivamente. Cabe mencionar que la sangre, con un hematocrito normal del 45%, presenta viscosidades de  $\sim 4.7$  cP. La viscosidad del plasma y del suero son 1.8 y 1.6 cP, respectivamente. Estos valores superan por mucho el coeficiente de viscosidad del medio RPMI-1640 tanto en ausencia como en presencia de células.

Por otra parte, a nivel de los vasos, en donde el flujo sanguíneo es lento (por ejemplo, en vénulas), debido a la formación de los agregados eritrocitarios, la viscosidad sanguínea se incrementa, lo que puede tener repercusiones importantes en la formación de metástasis, al incrementar la probabilidad de que las células metastásicas interaccionarán con la pared vascular. Estudios recientes apoyan esta idea. Rinker *et al.* (2001), incrementaron la viscosidad del medio RPMI-1640 (1.4-7.3 cP) mediante el uso de dextran para incrementar el la fuerza de rozamiento o "shear stress" (y la fuerza neta sobre las células), independientemente del "shear rate". -Ya que este medio, al igual que el  $H_2O$ , se comporta como un flujo Newtoniano, es decir, la viscosidad no depende de la velocidad de flujo-. Sus observaciones indicaron que el incremento en la viscosidad y "shear stress" correlacionó directamente con: (i) una disminución en las velocidades de "rolling"; (ii) una mayor frecuencia de adhesión de leucocitos y, (iii) una mayor duración del arresto leucocitario. Esto resalta la importancia de la viscosidad y del "shear stress" en los procesos de adhesión intercelular.

Ya que en el nuestro sistema, la viscosidad del medio RPMI-1640 se mantuvo constante no se afectó la adhesión. Sería interesante explorar el efecto del incremento de la viscosidad por dextran, en el número de células tumorales adheridas al endotelio vascular tanto en presencia como en ausencia de  $TNF-\alpha$ .

Por otro lado, que la magnitud de la fuerza de rozamiento es directamente proporcional a la viscosidad (Sears and Zemansky, 1979), la viscosidad del medio RPMI-1640 si afectó los valores del "shear stress".

En pacientes con cáncer la hemodinámica de la sangre puede ser alterada por cambios en la viscosidad sanguínea y propiedades de coagulación. Por ejemplo, en un estudio realizado a 31 pacientes con diferentes carcinomas viscerales, se determinó que la viscosidad de la sangre fue significativamente mayor en

comparación con pacientes normales. El factor que determinó este incremento fue la viscosidad plasmática elevada (Tietjen *et al.*, 1977). Al parecer, existe una correlación en el incremento de la viscosidad sanguínea con una mayor probabilidad de desarrollar trombosis en pacientes con alguna malignidad (von Tempelhoff *et al.*, 1998; 2000). Recientemente, se encontró un incremento significativo en los principales determinantes de la viscosidad sanguínea cuando las metástasis fueron clínicamente detectables (Millar and Heilmann, 1988; von Tempelhoff *et al.*, 2003). De hecho un nuevo parámetro en el diagnóstico de la fase mastásica es precisamente el incremento en la viscosidad plasmática y en la formación de agregados eritrocitarios (von Tempelhoff *et al.* 2002 y 2003).

Finalmente, estudios recientes indican que el porcentaje del hematocrito puede modular la adhesión entre leucocitos y células endoteliales. Munn *et al.* (1996), Abbitt y Nash (2003), mostraron que la adhesión de linfocitos a células endoteliales es promovida por la adición de eritrocitos. El número de leucocitos adheridos se incrementó significativamente cuando el hematocrito aumentó entre 10 y 30%, permaneciendo constante de 30 a 50%. Al parecer, la coalición entre leucocitos y eritrocitos ocasionó una dispersión de los primeros hacia la pared vascular donde formaron uniones estables con el endotelio. Además, existe evidencia que indica que los eritrocitos promueven la adhesión modificando la velocidad de flujo y la fuerza de rozamiento o "shear stress" cerca de la pared vascular (Abbitt and Nash, 2003). Esto es interesante para nuestro modelo, ya que se podría comprobar si la concentración celular de la sangre (hematocrito), también modula las interacciones entre células U937 y el endotelio vascular durante la metástasis tumoral.

#### **ADHESIÓN DE CÉLULAS TUMORALES A LA VASCULATURA DE LA VENA UMBILICAL HUMANA PERFUNDIDA**

En el presente estudio, las interacciones de células tumorales U937 con el endotelio vascular perfundido fueron investigadas en presencia de flujo laminar ( $N_R < 2000$ ) y niveles de fuerza de rozamiento o "shear stress" de 2.2 dinas/cm<sup>2</sup>; condiciones similares a las encontradas en venas humanas de pequeño calibre, tales como vénulas de 1 mm de diámetro, y vénulas post-capilares (Ley *et al.*, 1991; Brenner *et al.*, 1995). Cabe mencionar que, bajo condiciones fisiológicas

normales, el flujo de la sangre dentro de los vasos sanguíneos se comporta como un flujo laminar. Sin embargo, cuando se realiza ejercicio o la sístole se encuentra elevada, se presenta un régimen de tipo turbulento (Nerem, 1993).

En muchas instancias, se observaron células U937 con una forma esférica mientras que otras presentaron una forma aplanada tipo "disco", las cuales emitieron protrusiones citoplásmicas dirigidas hacia la cama vascular o haciendo contacto entre ellas (Fig. 33). El cambio a una morfología aplanada puede ser un mecanismo para evitar al máximo las fuerzas de rozamiento sobre la superficie, pues la deformación celular reduce la energía del fluido sobre el cuerpo celular. Además, este cambio ocasiona una disminución de la altura de las células, al incrementar la superficie de contacto con el endotelio. Este tipo de deformación celular, resulta en una mayor área de contacto leucocito-endotelio, que conduce a una mayor energía de adhesión necesaria para la formación de la unión receptor-ligando y por tanto resulta en una adhesión firme (Dong and Lei, 2000).

Los ensayos de adhesión dinámicos han revelado que, las células sufren un cambio de morfología bajo condiciones de flujo, pasando de una forma esférica a una forma tipo "lagrima" o "gota" (Dong and Lei, 2000). Estas deformaciones dependen del tamaño celular, viscosidad del citoplasma, y de la expresión de moléculas de adhesión (Dong and Lei, 2000). Cuando una célula circulante cambia a una forma tipo "gota" o aplanada, su viscosidad se incrementa, y el citoplasma disipa una mayor energía, resultando en una disminución en la velocidad de "rolling" (Dong and Lei, 2000). Por otra parte, la presencia de microvellosidades es un factor crítico en los contactos iniciales, ya que los receptores involucrados en el "rolling" de leucocitos se concentran en el ápice de estas estructuras (von Adrian *et al.*, 1995). Nosotros observamos numerosas microvellosidades en la superficie de las células U937, sugiriendo que estas estructuras pudieran participar en mediar en el proceso de adhesión.

La adhesión de células tumorales a monocapas de células endoteliales *in vitro* es frecuentemente seguida por retracción de algunas células y por una subsiguiente penetración de células malignas (Kramer and Nicolson, 1979; Voura *et al.*, 1998a y 1998b). En el presente trabajo, se observaron células U937 adheridas en o cerca de

---

las uniones inter-endoteliales (Fig. 35). Sin embargo, nunca observamos retracción de las células endoteliales en las zonas de adhesión.

Interesantemente, estudios por microscopía electrónica de transmisión revelaron la formación de pseudópodos en células U937, que penetraron en la monocapa endotelial, sugiriendo el posible inicio de la migración de las células tumorales. La adhesión y la subsiguiente invasión de células de melanoma B16 al endotelio cultivado *in vitro*, ocurre ~3 h (Kramer and Nicolson, 1979); mientras que *in vivo* los tiempos varían de 2-48 h (Ludatscher *et al.*, 1967).

Se realizaron estudios cuantitativos para determinar el número de células tumorales por unidad de área. Los resultados indicaron que el promedio total de células U937 adheridas al endotelio estimulado con TNF- $\alpha$ , fue significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) que el alcanzado en venas perfundidas no estimuladas con TNF- $\alpha$ . Resultados similares han sido obtenidos con HUVECs *in vitro* estimuladas con citocinas pro-inflamatorias (IL-1 y TNF- $\alpha$ ) y con diferentes líneas celulares, bajo condiciones de flujo fisiológico (Giavazzi *et al.*, 1993; Tözeren *et al.*, 1995). Sugiriendo, que los receptores inducidos por estas citocinas podrían participar en la adhesión intercelular.

La expansión hematógica de las células tumorales y la formación de metástasis en órganos secundarios son aspectos insidiosos del cáncer. Los dos principales conceptos que describen las metástasis están basados en la adhesión de células malignas al endotelio de vasos sanguíneos (hipótesis de la adhesión o "semilla y tierra"), o agregación homotípica de células tumorales (teoría del arresto mecánico) como un componente clave de la cascada metastásica (Glinsky, 1998). En el presente trabajo el diámetro de la vena excluye este tipo de agregación homotípica como relevante en la adhesión de células tumorales.

Si bien está bien documentado que el proceso de "rolling" de leucocitos es el paso inicial y limitante en la adhesión estable al endotelio (Springer, 1994), en el caso de las células tumorales esto no siempre es así. Mientras que las células de carcinoma de colón, DU-145 presentan "rolling" similar a leucocitos antes de formar interacciones adhesivas estables, otras se detuvieron abruptamente (Glinskii *et al.* 2003). Células de melanoma y osteosarcoma presentan mecanismos

similares (Orr *et al.*, 2000; Haier and Nicolson, 2001). Por tanto, si bien las células malignas circulantes pueden “rodar” sobre el endotelio vascular, el proceso de “rolling” no es un pre-requisito indispensable para su adhesión permanente a la cama vascular. En nuestro sistema de vena perfundida podríamos visualizar si las células U937 presentan “rolling” antes de adherirse.

Parece que en el proceso de adhesión las interacciones entre células tumorales y el endoteliales (interacciones heterotípicas) es seguida de interacciones entre células tumorales (interacciones homotípicas) (Glinsky *et al.*, 2000; Glinsky *et al.* 2003. Este proceso puede repetirse más de una vez para formar un agregado celular, por lo que, la adhesión homotípica parece ser un fenómeno cooperativo. Este tipo de interacciones son mediadas –en parte- por galectina-3, antígeno-T, y cadherina-E, dependiendo del tipo celular (Byers *et al.*, 1995).

Aunque en el presente trabajo no hemos podido documentar la secuencia de eventos que llevan a formación de superficies con muchas células U937 adheridas al endotelio no podemos excluir que en este procesos participen interacciones hetero- y homotípicas.

Las interacciones homotípicas de células tumorales U937 puede ser mediada por CD13 presentes en las micro-vellosidades que presentan (Riemann *et al.*, 1999; Navarrete-Santos *et al.*, 2000). Es interesante notar que este fenómeno solo se presentó en venas estimuladas con TNF- $\alpha$ , ya que bajo condiciones no estimuladas, las células U937 nunca formaron interacciones homotípicas entre si. Este fenómeno no solo está restringido a células neoplásicas, ya que también los leucocitos lo presentan (Farr and DeBruyn, 1975; van Ewijk *et al.*, 1975; Kunkel *et al.*, 1998). Todo esto refuerza la idea de que las células tumorales utilizan mecanismos de adhesión análogos a los que emplean los leucocitos durante su tránsito de la sangre a los tejidos.

Las células tumorales con un alto potencial metastásico tienen una mayor habilidad para formar agregados homotípicos comparados con células con un bajo potencial metastásico (Glinsky *et al.*, 2000; Khaldoyanidi *et al.*, 2003), lo que puede facilitar el “atrapamiento” mecánico intravascular en vasos de pequeño calibre. Asimismo, se ha demostrado que esta agregación celular correlaciona con la habilidad de las células malignas para sobrevivir y resistir la apoptosis (Glinsky *et al.*, 1997; Wong

*et al.*, 2001). Recientemente, Al-Mehdi *et al.* (2000), observaron que las metástasis se originan de la proliferación de células tumorales adheridas al endotelio vascular más que de células extravasadas.

Evidencia adicional sugiere que la adhesión heterotípica no es simplemente un resultado del atrapamiento mecánico; ya que, cuando la adhesión heterotípica no tiene lugar, las células tumorales (DU-145) muestran una gran habilidad para evitar la restricción de tamaño ajustando su forma y pasando a través de vasos estrechos (Glinsky *et al.*, 2003). Estos resultados contrastan con la teoría que propone que el único elemento que determina la invasión es el "arresto mecánico" (Chambers *et al.*, 1995; Thorlacius *et al.*, 1997). También, se ha postulado que después del arresto "pasivo" inicial y, como resultado del estrecho contacto con la pared vascular, se puede promover la subsecuente interacción mediada por receptores con el endotelio y/o componentes de ECM (Thorlacius *et al.*, 1997).

Todo lo anterior explica el arresto mecánico y/o la adhesión, pero no explica la invasión órgano-específica. Por ejemplo, las células de melanoma inyectadas en animales experimentales alcanzan la micro-vasculatura de muchos órganos, sin embargo, el crecimiento en el parénquima se da en forma órgano específica (Fidler, 1970; Sugarbaker, 1979). Tal es el caso de los carcinomas de mama, del tracto gastrointestinal y genitourinario, así como de los sarcomas de hueso y de los tumores trofoblásticos y tiroideos, que metastatizan preferentemente al pulmón (Müller and Respondek, 1990).

Los resultados muestran la existencia de zonas de la vasculatura desprovistas de células tumorales adheridas, mientras que en otras zonas se observan conglomerados de células neoplásicas adheridas al endotelio en venas tratadas con TNF- $\alpha$  (Fig. 37). Es posible que en las zonas libres de células se hubiera perdido la adhesión, liberando a las células tumorales nuevamente al medio de perfusión. Al seguir la cinética de adhesión *in vitro*, encontramos que existe un momento crítico que determina la formación de uniones estables (resultados preliminares de nuestro grupo). Estudios por microscopía intravital indican que una célula tumoral (MDA-MB-435, DU-145) puede desadherirse aún después de haber estado unida al endotelio vascular durante varios mili segundos, sugiriendo que existe un proceso de "aborto" durante la formación de uniones estables (Glinskii *et al.*, 2003; Glinsky

*et al.*, 2003). Estas observaciones apoyan la existencia de una heterogeneidad adhesiva, o zonas de mayor adhesión de células tumorales, o "hot spots" de adhesión endotelial (Glinskii *et al.*, 2003). El descubrimiento de los factores que definen esta heterogeneidad en la adhesión puede ser de gran importancia para entender los mecanismos moleculares y celulares que regulan la adhesión e invasión selectiva de células malignas (Khaldoyanidi *et al.* 2003). Recientemente, Glinskii *et al.* (2004), demostraron que esta activación selectiva es inducida tanto por estructuras tipo carbohidrato asociadas con la superficie de células tumorales (activación directa) como por glicoproteínas circulantes (activación indirecta) que podrían encontrarse en el suero de pacientes con alguna malignidad. Los "hot spots" corresponden a zonas donde se expresa predominantemente galectina-3 (Glinsky *et al.* (2004). En nuestro caso, parecería que estas secciones del vaso fueron activadas por el TNF- $\alpha$  evocando un número diferente de moléculas de adhesión.

Observamos la mayor densidad de células adherentes en "depresiones" o "valles" dentro de la vasculatura (Fig. 37), y en el endotelio revestido por el "glicocalix", mientras que las zonas desprovistas de células, correspondieron a un endotelio relativamente "liso" y con menos deformaciones (Fig. 37A). Por tanto, debe haber zonas de "transición" entre las regiones de alta densidad celular y las regiones desprovista de células. Damiano *et al.* (1996), observaron la existencia de cierta heterogeneidad en el "rolling" de leucocitos aún dentro del mismo vaso estudiado, sugiriendo que este fenómeno de heterogeneidad no está restringido a células neoplásicas.

Otra fuente de heterogeneidad endotelial son las irregularidades en su geometría superficial (Fig. 37). Bajo este escenario, algunos receptores pudieran estar físicamente inaccesibles a ligandos expresados por las células tumorales circulantes. Las regiones del endotelio que estén fuera del alcance de las moléculas de adhesión de células malignas pudieran ser consideradas como zonas de baja probabilidad de adhesión o incluso como "refractarias". Además, las irregularidades de la estructura y arreglo de la vasculatura debieran conducir a variaciones en el flujo local. Con respecto a ello, la velocidad de las células en relación al sustrato y las áreas de contacto inicial están directamente relacionadas

a la velocidad de flujo, mientras que la fuerza sobre la unión receptor-ligando está relacionada con el la fuerza de rozamiento o "shear stress" (Moazzam *et al.*, 1997; Haier *et al.*, 1999). Asimismo, se ha observado que la fuerza de rozamiento o "shear stress" modula la formación o retracción de pseudópodos en leucocitos (Moazzam *et al.*, 1997). Por si fuera poco, en contraste a los ensayos de adhesión estáticos, los factores biofísicos (tales como viscosidad, flujo laminar/turbulento) pueden influir en los procesos de adhesión bajo flujo (Rinker *et al.*, 2001) (ver la discusión en la sección dedicada a "viscosidad: repercusiones fisiológicas y patológicas"). En relación a esto último, y de acuerdo a los estudios hidrodinámicos, el flujo de "Poiseuille" en los vasos sanguíneos, está caracterizado por un perfil parabólico que obliga a las grandes partículas, tales como leucocitos o células malignas, a dirigirse hacia el centro de la luz del vaso donde se localizan las mayores velocidades; en tanto que las situadas junto a las paredes vasculares, sufren más roce ("shear stress") y por ello se mueven con más lentitud (Fig. 41) (Segre and Silberberg, 1962; Sears and Zemansky, 1979). Por lo tanto, el movimiento de las células tumorales y su subsecuente adhesión depende, no solo del endotelio y de moléculas de adhesión, sino también de las características del flujo.

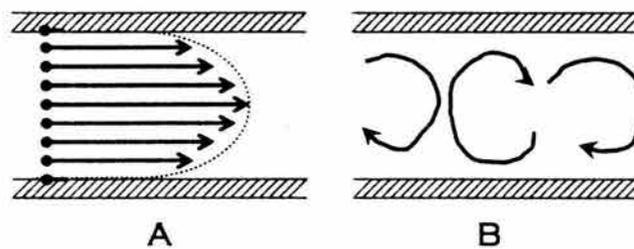


Figura 41 | Perfil de velocidad. a) Régimen laminar. Las moléculas del fluido se agrupan ordenadamente en "láminas" que se desplazan una sobre otra, de tal manera que las que están en el centro de la luz del vaso son las que tienen mayores velocidades, en tanto que las situadas junto a las paredes se mueven con más lentitud. En esa forma, el caudal que avanza tiene un perfil parabólico. b) Régimen turbulento. Cuando la velocidad excede de cierto valor crítico, la naturaleza del movimiento se hace mucho más complicada. Se producen, al azar, en el fluido corrientes locales e irregulares, denominadas vórtices o torbellinos, que originan un gran aumento de la resistencia al movimiento. Un régimen de esta clase se denomina turbulento. Tomado de Sears and Zemansky (1979).

Aunque, todas las preparaciones perfundidas fueron colocadas en un ángulo de  $\sim 45^\circ$ , y se podría argumentar que la sedimentación como resultado de la gravedad, pudo afectar la posición de las células tumorales y ocasionar su marginación a la pared vascular. Este no fue el caso, ya que la sedimentación debería de haber ocasionado la acumulación de células U937 a todo lo largo de la cara inferior interna del vaso, y no un patrón discontinuo, como el observado.

Otra fuente de diversidad es la heterogeneidad dentro de la población de las células tumorales U937. Está bien documentado que, los neoplasmas primarios y sus metástasis consisten de múltiples poblaciones celulares que presentan un amplio rango de características genéticas, bioquímicas, inmunológicas y biológicas, tales como cariotipo, morfología, propiedades de crecimiento, componentes de superficie celular y receptores, enzimas liberadas y almacenadas, sensibilidad a diferentes agentes terapéuticos, y la habilidad para invadir y metastizar. En neoplasmas malignos, la heterogeneidad suele ser más pronunciada que en su contraparte benigna o normal (Fidler and Hart, 1982).

Además, por si fuera poco, el microambiente órgano- y tejido-específico puede modificar y/o influir en la respuesta y comportamiento de una célula tumoral.

Por todo lo anterior, se puede proponer que la heterogeneidad entre zonas más propensas a la adhesión o "hot spots" dentro de la vasculatura, para adherir células malignas es un fenómeno complejo, multifactorial.

#### Cubierta superficial del endotelio

La superficie luminal del endotelio esta revestida por una delgada capa molecular, referida como "cubierta superficial del endotelio (ESL)"; la cual incluye moléculas unidas directamente a la membrana plasmática de las células endoteliales (glicocalix), y componentes adsorbidos del plasma sanguíneo (Fig. 42) (Pries *et al.*, 2000). Existe evidencia que indica que el "glicocalix" puede regular la adhesión leucocito-endotelio de manera negativa (Silvestro *et al.*, 1994; Mulivor and Lipowsky, 2002). Por el contrario, las vesículas asociadas a esta cubierta parecen mediar las interacciones entre células de melanoma B16 y el endotelio (Johnson *et al.*, 1991). En el presente estudio, las células "aplanadas" y con la emisión de proyecciones citoplásmicas correlacionaron con la presencia del "glicocalix",

sugiriendo que esta estructura puede jugar un papel importante durante la formación de uniones heterotípicas entre células tumorales endoteliales. Asimismo, estos datos sugieren que las interacciones de leucocitos y células malignas con el endotelio vascular presentan diferencias significativas.

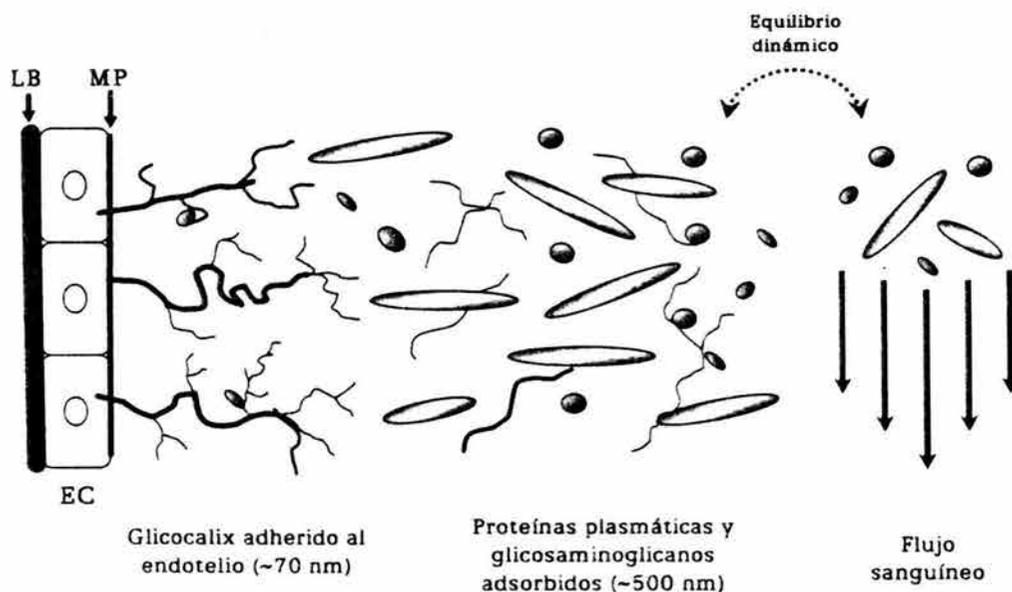


Figura 42 | Composición hipotética de la cubierta superficial del endotelio (ESL): una región endotelial dominada por moléculas (glicoproteínas y proteoglicanos) unidas directamente a la membrana plasmática (MP); el glicocalix en sentido estricto (50-100 nm). Sobre el glicocalix existe una capa mucho más gruesa (~0.5  $\mu\text{m}$ ), que consiste de un complejo tridimensional de componentes plasmáticos que posiblemente incluyen una variedad de proteínas y glicosaminoglicanos solubilizados. Esta capa se encuentra en equilibrio dinámico con el flujo sanguíneo. La composición y espesor de la ESL depende de la composición del plasma y de las condiciones hemodinámicas locales. Tomado de Pries *et al.* (2000).

## MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

De manera paralela a los estudios dirigidos en analizar la adhesión célula tumoral-endotelio, se iniciaron estudios orientados para identificar la presencia de moléculas de superficie que participaran en la adhesión intercelular entre el endotelio y las células tumorales U937. La función de reconocimiento célula-célula y célula-ECM, a través de diferentes moléculas de adhesión, es un mecanismo primordial para muchos procesos fisiológicos, tales como organogénesis, embriogénesis, e inflamación, entre otros. Recientemente, también se ha reconocido su importancia en la invasión y diseminación metastásica (Tang and Hong, 1994).

A pesar de las similitudes en la forma en que se adhieren los leucocitos y las células malignas al endotelio vascular nuestro grupo se ha reportado diferencias significativas (Estrada *et al.*, 2003), que correlacionan con diferencias en la participación de diferentes moléculas de adhesión (Springer, 1994). Por otra parte, diferentes estudios *in vitro* han confirmado la participación de diferentes moléculas de adhesión intercelular (por ejemplo, ICAM-1 en la adhesión de células de gliomas) (Tamaki *et al.*, 1995), y de adhesión vascular (por ejemplo, VCAM-1 en la adhesión de melanomas) (Vidal-Vanaclocha *et al.*, 2000) -ambas implicadas en la respuesta inflamatoria-, en mediar las interacciones de células malignas con el endotelio vascular. En estos casos es necesaria la expresión de integrinas que funcionan como contra-receptores específicos para estas moléculas. Desafortunadamente, no logramos analizar la expresión de estas dos moléculas de adhesión en nuestra preparación.

Sólo pudimos analizar la expresión de la integrina  $\beta 1$ , presente en la superficie del endotelio vascular y de células tumorales U937, que podría participar en las interacciones entre célula tumoral-endotelio. Se ha demostrado que la expresión de ciertas integrinas (por ejemplo,  $\alpha 3\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 4$  y  $\alpha v\beta 3$ ), están involucradas en la fase vascular de la metástasis, mientras que otras no están implicadas (Cooper and Pienta, 2000; Voura *et al.*, 2001; Brooksbank, 2002; Pilch *et al.*, 2002). Khaldoyanidi *et al.* (2003), reportaron que las integrinas  $\alpha 4$  y  $\beta 2$  no participan en mediar la adhesión de células de cáncer de próstata (DU-145) y mama (MDA-MB-435) al endotelio. Resultados similares fueron observados en el presente estudio (la no participación de la integrina  $\beta 2$ ). Por otra parte, los resultados sugieren un posible papel para la integrina  $\beta 1$  en mediar las interacciones heterotípicas entre células tumorales U937 y el endotelio vascular bajo condiciones de flujo. Existe evidencia que sugiere la participación de esta integrina en mediar la firme estabilización de la adhesión de células de carcinoma de colón HT29 a componentes de ECM (Haier *et al.*, 1999). Recientemente, Pilch *et al.* (2002), observaron que las integrinas  $\beta 1$  y  $\alpha v\beta 3$  cooperan entre si para mediar las interacciones de células de melanoma M21. Por el contrario, al parecer la integrina  $\beta 1$  no participa en el "rolling" de células malignas, ya que este proceso se presenta

independientemente de su expresión (Haier *et al.*, 1999). Para definir su posible participación en el presente modelo, se podrían emplear anticuerpos neutralizantes anti-integrina- $\beta 1$  y evaluar el número de células U937 adheridas al endotelio vascular perfundido.

Por otra parte, estos resultados sugieren la posible participación de otras moléculas de adhesión, tales como selectina-P y -E, fractalcina y ESM-1, las cuales pueden ser inducidas por citocinas pro-inflamatorias (Meagher *et al.*, 1994; Tözeren *et al.*, 1995; Fong *et al.*, 1998). Recientes estudios indican el papel crucial que juega galectina-3 en mediar la adhesión homo- y heterotípica (célula tumoral-célula tumoral, y célula tumoral-endotelio, respectivamente). Khaldoyanidi *et al.* (2003), y Glinskii *et al.* (2004), observaron que tanto HUVECs como el endotelio microvascular de dura madre de porcino, presentan niveles bajos de galectina-3. Sin embargo, las interacciones con células tumorales ocasiona un rápido incremento en la expresión y redistribución intercelular de galectina-3 en los sitios de contacto heterotípico. Interesantemente, recientes estudios indican que la galectina-3 y otro miembro de esta familia, galectina-1, son inductores de apoptosis en linfocitos T activados. Sugiriendo que ambas galectinas pueden jugar papeles muy importantes como mecanismos de evasión de la respuesta inmune durante la formación de metástasis (Fukumori *et al.*, 2003). Por lo que sería interesante analizar la expresión y distribución de dichas lectinas, antes y después de la firme adhesión entre células tumorales U937 y el endotelio umbilical perfundido.

La evidencia acumulada sugiere que bajo condiciones de flujo, células de diferentes tipos de tumor parecen interactuar con la superficie endotelial por diferentes mecanismos, dependiendo de las moléculas de adhesión expresadas en la superficie del endotelio vascular y de las células tumorales. Scherbarth y Orr (1997), observaron que el repertorio de moléculas de adhesión expresadas en la vasculatura hepática varió entre diferentes compartimientos anatómicos dentro de los lóbulos hepáticos. Sugiriendo que aún dentro de un órgano en particular existen zonas más propensas a expresar un número diferente de moléculas de adhesión.

## CONCLUSIONES

Hemos establecido un sistema de perfusión *ex vivo* de vena umbilical humana en el que la monocapa endotelial mantiene su viabilidad y capacidad funcional de responder a estímulos fisiológicos y externos. Este sistema puede servir como modelo para estudiar los procesos que ocurren durante la metástasis y, estudiar las moléculas que participan en la adhesión entre las células tumorales humanas U937 y el endotelio vascular *in situ*.

## COMENTARIOS FINALES

Dado que hemos logrado perfundir la vena umbilical humana disectada del resto del cordón umbilical, se abre la posibilidad de realizar microscopía intravital y observar en "tiempo real" las interacciones entre células tumorales y el endotelio vascular *in situ*.

Además, se podría determinar: (i) si el proceso de "rolling" es un requisito necesario o no para la adhesión permanente a la cama vascular; (ii) si la adhesión heterotípica precede a la formación de agregados homotípicos; (iii) ¿cuáles son los valores de los parámetros físicos relevantes para la adhesión de células tumorales al endotelio? Tales como la fuerza de la adhesión, el área de contacto, la velocidad de las células y análisis cinético del arresto, entre otras.

Cabe mencionar que ya se han empezado a realizar algunos cálculos aproximados. Cuando una esfera (o célula –en este caso–) se mueve dentro de un fluido viscoso, actúa una fuerza resistente sobre ella. Esta fuerza esta dada por  $R=6\pi\eta rv$ , siendo  $\eta$  el coeficiente de viscosidad;  $r$ , el radio de la esfera o célula, y  $v$ , su velocidad respecto al fluido. Esta relación fue deducida por primera vez por sir George Stokes en 1845 y se denomina *ley de Stokes* (Sears and Zemansky, 1979). Si se aplica una aceleración, la esfera adquiere una velocidad y experimenta, una resistencia que puede calcularse por la ley de Stokes. Puesto que la velocidad aumenta, la resistencia aumenta también en proporción directa, y la esfera –o célula– llegará a alcanzar una velocidad tal que la fuerza de desplazamiento y la resistencia se

iguales. Entonces deja de aumentar la velocidad, y la esfera se mueve con una velocidad constante llamada *velocidad límite*. Esta velocidad puede calcularse con la siguiente fórmula:  $v = \frac{2}{9} \frac{r^2 g}{\eta} (\rho - \rho_0)$ , donde  $\rho$  es la densidad de la esfera/célula, y  $\rho_0$  es la densidad del medio.

Al sustituir los valores de viscosidad, gravedad, radio, y densidad se obtuvieron los siguientes valores:  $1.03 \times 10^{-5}$  cm/s. Estos datos indican que la velocidad límite se alcanza a una distancia muy corta del punto de partida.

El sistema que hemos desarrollado permite aproximarse a varias de estas interrogantes y puede emplearse de manera complementaria con cultivos primarios de las mismas células endoteliales derivadas de la vena del cordón umbilical humano para identificar los factores tumorales que modifican el fenotipo endotelial y las moléculas de adhesión que participan en la adhesión.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Abbitt, K.B., and Nash G.B. (2003). Rheological properties of the blood influencing selectin-mediated adhesion of flowing leukocytes. *Am J Physiol* 285: H229-H240.
2. Aigner, S., Ramos C.L., Hafezi-Moghadam A., Lawrence M.B., Friederichs J., Altevogt P., and Ley K. (1998). CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J* 12: 1241-1251.
3. Akar, F., Ark M., Uydes B.S., Soysal M.E., Saracoglu F., Abacioglu N., van de Voorde J., and Kanzik I. (1994). Nitric oxide production by human umbilical vessels in severe pre-eclampsia. *J Hypertens* 12: 1235-1241.
4. Al-Mehdi, A.B., Tozawa T., Fisher A.B., Shientag L., Lee A., and Muschel R.J. (2000). Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med* 6(1): 100-102.
5. Alonso C., Pries A.R., and Gaehtgens P. (1993). Time-dependent rheological behavior of blood at low shear in narrow vertical tubes. *Am J Physiol* 265: H553-H561.
6. Alonso C., Pries A.R., Kiesslich O., Lerche D., and Gaehtgens P. (1995). Transient rheological behavior of blood in low-shear tube flow: velocity profiles and effective viscosity. *Am J Physiol*. 268: H25-H32.
7. Anasagasti, M.J., Alvarez A., Avivi C., and Vidal-Vanaclocha F. (1996). Interleukin-1-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by hepatic sinusoidal endothelium in response to B16 melanoma cell adhesion. *J Cell Physiol* 167: 314-323.
8. Anasagasti, M.J., Alvarez A., Martin J.J., Mendoza L., and Vidal-Vanaclocha F. (1997). Sinusoidal endothelium release of hydrogen peroxide enhances very late antigen-4-mediated melanoma cell adherence and tumor cytotoxicity during interleukin-1 promotion of hepatic melanoma metastasis in mice. *Hepatology* 25: 840-846.
9. Aplin A.E., Howe A., Alahari S.K., and Juliano R.L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50: 197-263.
10. Auerbach R., Alby L., Morrissey W., Tu M., and Joseph J. (1985). Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc Res* 29: 401-411.
11. Augustin, H.G., Kozian D.H., and Johnson R.C. (1994). Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *BioEssays* 16 (12): 901-906.

12. Babbs, C.F. (1994). Histochemical methods for localization of endotelial superoxide and hydrogen peroxide generation in perfused organs. In: *Methods in Enzymology* 233: 619-630.
13. Bachmann, F., and Kuithf I.E. (1984). Tissue plasminogen activator: chemical and physiological aspects. *Semin Thromb Hemost* 10: 6-17.
14. Baker, P.F. (1984). Intracellular perfusion and dialysis: application to large nerve and muscle cells. In: Kostyuk, P.A., and Krishtal O.A. (Eds). *Intracellular perfusion of excitable cells*. John Wiley and Sons Ltd. Norwich. 1-17.
15. Barbera-Guillem, E., and Weiss L. (1993). Cancer-cell traffic in the liver. III Lethal deformation of B16 melanoma cells in liver sinusoids. *Int J Cancer* 54(5): 880-884.
16. Barresi, R., Moore S.A., Stolle C.A., Mendell J.R., and Campbell K.P. (2000). Expression of  $\gamma$ -sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycansarcospan complex. *J Biol Chem* 275: 38554-38560.
17. Beck, K.-F., Eberhardt W., Frank S., Huwiler A., Meßmer U.K., Mühl H., and Pfeilschifter J. (1999). Inducible NO synthase: role in cellular signaling. *J Exp Biol* 202: 645-653.
18. Behrens, J. (1999). Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 18: 15.30.
19. Bergers, G., and Benjamin L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3: 401-410.
20. Bernard, C. (1869). Discours prononcé à sa réception al' Académie française le 27 mai 1869. Paris: Didier.
21. Bernards, R., and Weinberg R.A. (2002). A progression puzzle. *Nature* 418: 823.
22. Bernards, R. (2003). Cues for migration. *Nature* 425: 247-248.
23. Berry, M.N., and Friend D.S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43: 506-520.
24. Berry, M.N., Edwards A.M., and Barritt G.J. (1991). Isolated hepatocytes preparation, properties and applications. In: Burdon R.H., and van Knippenberg (Eds.). *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier Science Publisher. Netherlands.
25. Berry, M.N., and Phillips J.W. (2000). The isolated hepatocyte preparation: 30 years on. *Biochem Soc Trans* 28: 131-135.
26. Bhalla, D.K., Braun J., and Karnovsky M.J. (1979). Lymphocyte surface and cytoplasmic changes associated with translational motility and spontaneous capping of Ig. *J Cell Sci* 39: 137-147.

27. Birchmeier, W., and Behrens J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198: 11-26.
28. Blasi, F. (1993). Molecular mechanisms of protease-mediate tumor invasiveness. *J Surg Oncol Suppl* 3: 21-23.
29. Boo, Y.C., Hwang J., Sykes M., Michell B.J., Kemp B.E., Lum H., and Jo H. (2002a). Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser<sup>635</sup> by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol* 283: H1819-H1828.
30. Boo, Y.C., Sorescu G., Boyd N., Shiojima I., Walsh K., Du J., and Jo H. (2002b). Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser<sup>1179</sup> by AKT-independent mechanism. *J Biol Chem* 277: 3388-3396.
31. Borsig, L., Wong R., Hynes R.O., Varki N.M., and Varki A. (2002). Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (4): 2193-2198.
32. Borysiewicz, L.K., Fiander A., Nimako M., Man S., Wilkinson G.W., Westmoreland D., Evans A., Adams M., Stacey S.N., Bournsnel M.E., Rutherford E., Hickling J.K., and Inglis S.C. (1996). A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 347(9014): 1523-1527.
33. Bottaro, D.P., and Liotta L.A. (2003). Out of air is not out of action. *Nature* 423: 593-595.
34. Bougelet, C., Roland I.H., Ninane N., Arnould T., Remacle J., and Michiels C. (1998). Effect of aescine on hypoxia-induced neutrophil adherence to umbilical vein endothelium. *Eur J Pharmacol* 345: 89-95.
35. Bournsnel, M.E., Rutherford E., Hickling J.K., Rollinson E.A., Munro A.J., Rolley N., McLean C.S., Borysiewicz L.K., Vousden K., and Inglis S.C. (1996). Construction and characterization of a recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus proteins for immunotherapy of cervical cancer. *Vaccine* 14(16): 1485-1494.
36. Brenner, W., Langer P., Oesch F., Edgell C.-J. S., and Wieser R.J. (1995). Tumor cell-endothelium adhesion in an artificial venule. *Analytical Biochem* 225: 213-219.
37. Brooks, D.E. (1984). The biorheology of tumor cells. *Biorheology* 21: 85-91.
38. Brooksbank, C. (2002). Adaptable integrins. *Nat Rev Cancer* 2: 3.
39. Bruns, R.R., and Palade G.E. (1968). Studies on blood capillaries. I. General organization of blood capillaries in muscle. *J Cell Biol* 37: 244-276.

40. Chambers, A.F., MacDonald I.C., Schmidt E.E., Koop S., Morris V.L., Khoka R., and Groom A.C. (1995). Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer Metastasis Rev* 14: 279-301.
41. Chambers, A.F., Gromm A.C., and MacDonald I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2: 563-572.
42. Chen, B.P.C., Li Y.-S., Zhao Y., Chen K.-D., Li S., Lao J., Yuan S., Shyy J.Y.-J., and Chien S. (2001). DNA microarray analysis of gene expression in endothelial cells in response to 24-h shear stress. *Physiol Genomics* 7: 55-63.
43. Christofori, G., and Semb H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-supressor gene. *Trends Biochem Sci* 24: 73-76.
44. Cooper, C.R., and Pienta K.J. (2000). Cell adhesion and chemotaxis in prostate cancer metastasis to bone: a minireview. *Prost Cancer Prost Dis* 3: 6-12.
45. Criborn, C.O., Franzen S., Unsgaard B., and Zajicek J. (1964). Studies on the effect of aspiration biopsy on the viability of aspirated cells. I. Registration of pressure differences during aspiration. *Scan J Haematol* 117: 272-279.
46. Cross, M.J., and Claesson-Welsh L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 22(4): 201-207.
47. Crowley, C.M., Lee C.-H., Gin S.A., Keep A.M., Cook R.C., and Breemen C.V. (2002). The mechanism of excitation-contraction coupling in phenylephrine-stimulated human saphenous vein. *Am J Physiol* 283: H1271-H1281.
48. Chien, S. (1987). Physiological and pathophysiological significance of hemorheology In: *Clinical Hemorheology*. Chien, S., S. Dormandy, E. Ernst, and A. Matai. Dordrecht, Martinus Nijhoff, pp 125-164.
49. Chen, B.P.C., Li Y.-S., Zhao Y., Chen K.-D., Li S., Lao J., Yuan S., Shyy J.Y.-J., and Chien S. (2001). DNA microarray analysis of gene expression in endothelial cells in response to 24-h shear stress. *Physiol Genomics* 7: 55-63.
50. Damiano E.R., Westheider J., Tozeren A., and Ley K. (1996). Variation in the velocity, deformation, and adhesion energy density of leukocytes rolling within venules. *Circ Res* 79: 1122-1130.
51. de Assis, M.C., Plotkowski M.C., Fierro I.M., Barja-Fidalgo C., and de Freitas M.S. (2002). Expression of inducible nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells during primary culture. *Nitric Oxide* 7: 254-261.
52. DeBakey, M.E. (2000). The odyssey of the artificial Herat. *Artificial Organs* 24 (6): 405-411.

- 
53. Diamandopoulos, G.Th. (1996). Cancer: An historical perspective. *Anticancer Res* 16: 1595-1602.
54. Di Naro, E., Ghezzi F., Raio L., Franchi M., D'Addario V., Lanzillotti G., and Schenider H. (2001). Umbilical vein blood flow in fetuses with normal and lean umbilical cord. *Ultrasound Obstet Gynecol* 17: 224-228.
55. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud de México. Registro Histopatológico de Neoplasias en México (1997): 15-28.
56. Dong, C., and Lei X.X. (2000). Biomechanics of cell rolling: shear flow, cell-surface adhesion, and cell deformability. *J Biomech* 33(1): 35-43.
57. Döring, H.J., and Dehnert H. (1988). The isolated perfused warm-blooded heart according to Langendorff. *Biological Measurement Techniques V*. 127 pp.
58. Doroudi, R., Gan, L., Sjögren L.S., and Jern S. (2000). Effects of shear stress eicosanoid gene expression and metabolite production in vascular endothelium as studied in a novel biomechanical perfusion model. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 257-264.
59. el-Sabban, M.E., and Pauli B.U. (1991). Cytoplasmic dye transfer between metastatic tumor cells and vascular endothelium. *J Cell Biol* 115: 1375-1382.
60. el-Sabban, M.E., and Pauli B.U. (1994). Adhesion-mediated gap junctional communication between lung metastatic cancer cells and endothelium. *Invasion Metastasis* 14: 164-176.
61. Edelman, J.M., DiMilla P.A., and Albelda S.M. (1995). The integrin cell adhesion molecules. In: Richardson, P.P., and Steiner M. (Eds). *Principles of cell adhesion*. CRC press. USA. 163-186.
62. Engers, R., and Gabbert H.E. (2000). Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 126: 682-692.
63. Estrada-Bernal, A., Mendoza-Milla C., Ventura-Gallegos J.L., Lopez-Bojorquez L.N., Miranda-Peralta E., Arechavaleta-Velasco F., Vadillo-Ortega F., Sanchez-Sanchez L., and Zentella-Dehesa A. (2003). NF-kappaB dependent activation of human endothelial cells treated with soluble products derived from human lymphomas. *Cancer Lett* 191(2): 239-248.
64. Ewing, J. (1928). *Neoplastic diseases*. 6<sup>th</sup> edn. WB Saunders, Philadelphia and London. 77-89.
65. Farr, A.G., and DeBruyn P.P.H. (1975). The mode of lymphocyte migration through postcapillary venule endothelium in lymph node. *Am J Anat* 143: 59-92.
66. Fidler, I.J. (1970). Metastasis: quantitative analyses of distribution and fate of tumor emboli labeled with <sup>125</sup>I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 45: 773-782.
-

- 
67. Fidler, I.J., and Hart I.R. (1982). Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 217: 998-1003.
  68. Fidler, I.J. (1995). Modulation of the organ microenvironment for the treatment of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 84: 1588-1592.
  69. Fidler, I.J. (2002a). The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* 70: 498-505.
  70. Fidler, I.J. (2002b). Critical determinants of metastasis. *Sem Cancer Biol* 12: 89-96.
  71. Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3(6): 453-458.
  72. Fischer, B.E., Kramer G., Mitterer A., Grillberger L., Reiter M., Mundt W., Dorner F., and Eibl J. (1996). Effect of multimerization of human and recombinant von Willebrand factor on platelet aggregation, binding to collagen and binding of coagulation factor VIII. *Thromb Res* 84: 55-66.
  73. Foekens, J.A., Peters H.A., Look M.P., Portengen H., Schmitt M., Kramer M.D., Brünner N., Jänicke F., Meijer-van Gelder M.E., Henzen-Logmans S.C., van Putten W.L.J., and Klijn J.G.M. (2000). The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* 60: 636-643.
  74. Fogar, P., Basso D., Pasquali C., De Paoli M., Sperti C., and Roveroni G. (1997). Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Res* 17: 1227-1230.
  75. Fong, A.M., Robinson L.A., Steeber D.A., Tedder T.F., Yoshie O., Imai T., and Patel D.D. (1998). Fractalkine and CX<sub>3</sub>CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med* 188: 1413-1419.
  76. Foulds, L. (1954). The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 14(5): 327-339.
  77. Foulds, L. (1956). The histologic analysis of mammary tumors of mice. *J Natl Cancer Inst* 17(6): 701-801.
  78. Friedl, P., and Wolf K. (2003). Tumor-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3: 362-374.
  79. Fuchs and Netz. (2002). Ventricular assist device in pediatrics. *Images Paediat Cardiol* 9:24-54.
  80. Fukumori, T., Takenaka Y., Yoshii T., Kim H.-R.C., Hogan V., Inohara H., Kagawa S., and Raz A. (2003). CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res* 63: 8302-8311.

81. Fye, W.B. (1986). H Newell Martin and the isolated heart preparation: the link between the frog and open heart surgery. *Cardiology* 73(5): 857-864.
82. Fye, W.B. (1991). Carl Ludwig. *Clin Cardiol* 14: 361-363.
83. Fye, W.B. (1995). Julien Jean César Legallois. *Clin Cardiol* 18: 599-600.
84. Gabbert, H.E., Meier S., Gerharz C.D., and Hommel G. (1991). Incidence and prognostic significance of vascular invasion in 529 gastric cancer patients. *Int J Cancer* 49: 203-207.
85. Gabbert, H.E., Meier S., Gerharz C.D., and Hommel G. (1992). Tumor-cell dissociation at the invasive front: a new prognostic parameter in gastric cancer patients. *Int J Cancer* 50: 202-207.
86. Gailit, J., and Ruoslahti E. (1988). Regulation of the fibronectina receptor affinity by divalent cations. *J Biol Chem* 263(26): 12927-12932.
87. Gan, L., Sjögren L.S., Doroudi R., and Jern S. (1999). A new computerized biomechanical perfusion model *ex vivo* study of fluid mechanical forces in intact conduit vessels. *J Vasc Res* 36: 68-78.
88. Gan, L., Miocic M., Doroudi R., Sjögren L.S., and Jern S. (2000a). Distinct regulation of vascular endothelial growth factor in intact human conduit vessels exposed to laminar fluid shear stress and pressure. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 490-496.
89. Gan, L., Doroudi R., Hägg U., Johansson A.-M., Sjögren L.S., and Jern S. (2000b). Differential immediate-early gene responses to shear stress and intraluminal pressure in intact human conduit vessels. *FEBS Letters* 477: 89-94.
90. Gasic, A.C., McGuire G., Krater S., Farhood A.I., Goldsteim M.A., Smith C.W., Entman M.L., and Taylor A.A. (1991). Hydrogen peroxide pretreatment of perfused canine vessels induces ICAM-1 and CD18-dependent neutrophil adherence. *Circulation* 84: 2154-2166.
91. Georgiou, H.M., Rice G.E., Walker S.P., Wein P., Gude N.M., and Permezel M. (2001). The effect of vascular coiling on venous perfusion during experimental umbilical cord encirclement. *Am J Obstet Gynecol* 184: 673-678.
92. Gething, M.J., Adler B., Bosse I.A., Gerard R.D., Madison E.L., McGookey D., Meidell R.S., Roman L.M., and Sambrook J. (1988). Variants of tissue-type plasminogen activator that lacks specific structural domains of heavy chain. *EMBO J* 7: 2731-2740.
93. Giacotti, F.G., and Ruoslahti E. (1999). Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032.
94. Giavazzi, R., Foppolo M., Dossi R., and Remuzzi A. (1993). Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions. *J Clin Invest* 92: 3038-3044.

- 
95. Gimbrone, M.A., Cotran R., and Folkman J. (1974). Tumor growth and neovascularization: an experimental model using rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 52: 413-427.
  96. Gimbrone, M.A. (1997). Hemodynamics, endothelial gene expression and atherogenesis. *Ann NY Acad Sci* 811: 1-10.
  97. Glinskii, O.V., Huxley V.H., Turk J.R., Deutscher S.L., Quinn T.P., Pienta K.J., and Glinsky V.V. (2003). Continuous real time *ex vivo* epifluorescent video microscopy for the study of metastatic cancer cell interactions with microvascular endothelium. *Clin Exp Metastasis* 20: 451-458.
  98. Glinskii, O.V., Turk J.R., Pienta K.J., Huxley V.H., and Glinsky V.V. (2004). Evidence of porcine and human endothelium activation by cancer-associated carbohydrates expressed on glycoproteins and tumor cells. *J Physiol* 554: 89-99.
  99. Glinsky, G.V., Glinsky V.V., Ivanova A.B., and Hueser C.J. (1997). Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Lett* 115: 185-193.
  100. Glinsky, G.V. (1998). Anti-adhesion cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 17: 177-185.
  101. Glinsky, V.V., Huflejt M.E., Glinsky G.V., Deutscher S.L., and Quinn T.P. (2000). Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on  $\beta$ -galactoside-mediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 60: 2584-2588.
  102. Glinsky, V.V., Glinsky G.V., Rittenhouse-Olson K., Huflejt M.E., Glinskii O.V., Deutscher S.L., and Quinn T.P. (2001). The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium. *Cancer Res* 61: 4851-4857.
  103. Gore, G.J., Flarsheim C.E., Dawson T.L., Nieminen A.L., and Herman Lemasters J.J. (1989). Swelling, reductive stress, and cell death during chemical hypoxia in hepatocytes. *Am J Physiol* 257(2 Pt 1):C347-C354.
  104. Green, L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., and Tannenbaum S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}\text{N}$ ]-nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138.
  105. Gomperts, B.D. (1984). Calcium and cellular activation. In: Chapman D. (Eds). *Biological membranes*, Vol. 5. Academic Press Inc. London, UK. 289-348.

106. Gumbiner, B.M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345-357.
107. Haier, J., and Nicolson G.L. (2001). Tumor cell adhesion under hydrodynamic conditions of fluid flow. *APMIS* 109: 241-162.
108. Hajjar, K.A., and Hamel N.M. (1990). Identification and characterization of human endothelial cell membrane binding sites for tissue plasminogen activator and urokinase. *J Biol Chem* 265: 2908-2916.
109. Hanahan, D., and Weinberg R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
110. Hart, I.R., and Fidler I.J. (1980). Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res* 40: 2281-1187.
111. Heyder, C., Gloria-Aercker E., Entschladen F., Hatzmann W., Niggemann B., Zänker K.S., and Dittmar T. (2002). Realtime visualization of tumor cell/endothelial cell interactions during transmigration across the endothelial barrier. *J Cancer Res Clin Oncol* 128: 533-538.
112. Hirst, R., Horwitz A.F., Buck C., and Rohrschneider L. (1986). Phosphorylation of the fibronectin receptor complex in cells transformed by oncogenes that encoded tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6470-6474.
113. Honn, K.V., Tang D.G., Grossi I.M., Renaud C., Duniec Z.M., Johnson C.R., and Diglio C.A. (1994). Enhanced endothelial cell retraction mediated by 12(S)-HETE: a proposed mechanism for the role of platelets in tumor cell metastasis. *Exp Cell Res* 210: 1-9.
114. Hood, J.D., and Cheresch D.A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2: 91-99.
115. Horan, P., and Slezak S. (1989). Stable cell membrane labelling. *Nature* 340: 167-168.
116. Hunter, K., Welch D.R., and Liu E.T. (2003). Genetic background is an important determinant of metastatic potential. *Nat Genet* 34: 23-24.
117. Ignarro, L.J., Cirino G., Casini A., and Napoli C. (1999). Nitric Oxide as signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34: 879-886.
118. Iwai, K., Iwai K., Ishikura H., Kaji M., Sugiura H., Ishizu A., Takahashi C., Kato H., Tanabe T., and Yoshiki T. (1993). Importance of E-selectin (ELAM-1) and sialyl Lewis (a) in the adhesion of pancreatic carcinoma cells to activated endothelium. *Int J Cancer* 54: 972-977.
119. Jaffe, E.A., Nachmen R.L., Becker G.C., and Minick C.R. (1973). Culture of human endothelial cells from umbilical veins. *J Clin Invest* 52: 2745-2756.

- 
120. Johnson, R.C., Augustin-Voss H.G., Zhu D., and Pauli B.U. (1991). Endothelial cell membrane vesicles in the study of organ preference of metastasis. *Cancer Res* 51: 394-399.
  121. Johnson, J.P. (1991). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* 10: 11-22.
  122. Johnson, J.P., Rammel M.M., Rothbacher U., and Sers C. (1996). MUC18: a cell adhesion molecule with a potential role in tumor growth and tumor cell dissemination. *Curr Topics Micro Immunol* 213(I): 95-105.
  123. Johnson, J.P. (1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 18: 345-357.
  124. Jones, D.A., Smith C.W., and McIntire L.V. (1996). Methods for *in vitro* analysis of leukocyte adhesion under flow conditions. In: Weir's handbook of experimental immunology Vol. II. Herzenber, L.A., D.M. Weir (Editors). Blackwell Science Australia, pp 69.1-69.10.
  125. Kaiser, U., Auerbach B., and Oldenburg M. (1996). The neural cell adhesion molecule NCAM in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 20: 389-395.
  126. Kang, Y., Siegel P.M., Shu W., Drobnjak M., Kakonen S.M., Córdón-Cardo C., Guise T.A., and Massagué J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3: 537-549.
  127. Kannagi, R. (1997). Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconj J* 14: 577-584.
  128. Keleg, S., Büchler P., Ludwig R., Büchler M.W., and Friess H. (2003). Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2: 14-20.
  129. Khaldoyanidi, S.K., Glinsky V.V., Sikora L., Glinskii A.B., Mossine V.V., Quinn T.P., Glinsky G.V., and Sriramarao P. (2003). MDA-MB-435 human breast carcinoma cell homo- and heterotypic adhesion under flow conditions is mediated in part by Thomsen-Friedenreich antigen-galectin-3 interactions. *J Biol Chem* 278(6): 4127-4137.
  130. Koop, S., MacDonald I.C., Luzzi K., Schmidt E.E., Morris V.L., Grattan M., Khokha R., Chambers A.F., and Groom A.C. (1995). Fate of melanoma cells entering the microcirculation: over 80% survive and extravasate. *Cancer Res* 55(12): 2520-2523.
  131. Kramer, R.H., and Nicolson G.L. (1979). Interactions of tumor cells with vascular endothelial cell monolayer: a model for metastatic invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(11): 5704-5708.

132. Krause, T., and Turner G.A. (1999). Are selectins involved in metastasis? *Clin Exp Metastasis* 17: 183-192.
133. Kurschat, P., and Mauch C. (2000). Mechanisms of metastasis. *Clin Exp Dermatol* 25: 482-489.
134. Lauffenburger, D.A., and Horwitz A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84: 359-369.
135. Lewalle, J.M., Bajou K., Desreux J., Mareel M., Dejana E., Noel A., and Foidart J.-M. (1997). Alteration of interendothelial adherens junctions following tumor cell-endothelial cell interaction *in vitro*. *Exp Cell Res* 237: 347-356.
136. Ley, K., Gaehtgens P., Fennie C., Singer M.S., Lasky L.A., and Rosen S.D. (1991). Lectin-like adhesion molecule-1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules *in vivo*. *Blood* 77: 2553-2555.
137. Liao J., Keiser J.A., Keiser A., Scales W.E., Kunkel S.L., and Kluger M.J. (1995a). Role of corticosterone in TNF and IL-6 production in isolated perfused rat liver. *Am J Physiol* 268: R639-R706.
138. Liao J., Keiser J.A., Keiser A., Scales W.E., Kunkel S.L., and Kluger M.J. (1995a). Role of epinephrine in TNF and IL-6 production in isolated perfused rat liver. *Am J Physiol* 268: R896-R901.
139. Liotta, L.A., Abe S., Robey P.G., and Martin G.R. (1979). Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2268-2272.
140. Liotta, L.A., Goldfarb R.H., and Brundage R. (1991). The effect of plasminogen activators (urokinase), plasmin and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res* 41: 4629-4636.
141. Liotta, L.A. (2001). An attractive force in metastasis. *Nature* 410: 24-25.
142. Lodish, H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky S.L., and Darnell S. (2004). *Molecular cell biology*. Freeman and Company. New York, USA. 973.
143. Lollini, P.L., De Giovanni C., Nocoletti G., Bontadini A., Tazzari P.L., Landuzzi L., Scotlandi K., and Nanni P. (1990). Enhancement of experimental metastatic ability by tumor necrosis factor-alpha alone or in combination with interferon-gamma. *Clin Exp Metastasis* 8: 215-224.
144. Ludatscher, R.M., Luse S.A., and Suntzeff V. (1967). An electron microscopic study of pulmonary tumor emboli from transplantable Morris hepatoma 5123. *Cancer Res* 27: 1939-1952.

- 
145. Lukashev, M.E., and Werb Z. (1998). ECM signaling: orchestrating cell behavior and misbehavior. *Trends Cell Biol* 8: 437-441.
  146. Luttun, A., Carmeliet G., and Carmeliet P. (2002). Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med* 12: 88-96.
  147. Majno, G., and Joris I. (1978). Endothelium 1977: a review. *Adv Exp Med Biol* 104: 169-225, 481-526.
  148. Malek, A.M., and Izumo S. (1994). Molecular aspects of signal transduction of shear stress in the endothelial cell. *J Hypertens* 12: 989-999.
  149. Marchesi, V.T., and Gowans J.L. (1964). The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: an electron microscope study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 159: 283-290.
  150. Marsh, N.A. (1979). Langendorff and the perfused heart. *J Physiol* 291: 3P-4P.
  151. Martin, H.N. (1881). A new method of studying the mammalian hearth. *Stud Biol Lab Johns Hopkins University* 2: 119.
  152. Masson, N., and Ratcliffe P.J. (2003). HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O<sub>2</sub> levels. *J Cell Sci* 116(15): 3041-3049.
  153. Mehvar, R., Reynolds J.M., Robinson M.A., and Longstreth J.A. (1994). Enantioselective kinetics of verapamil and norverapamil in isolated perfused rat livers. *Pharm Res* 11: 1815-1819.
  154. Mehvar, R., and Zhang Z. (2002). Development and application of an isolated perfused rat liver model to study the stimulation and inhibition of tumor necrosis factor-production *ex vivo*. *Pharm Res* 19: 47-53.
  155. McCormick, S.M., Eskin S.G., McIntire L.V., Teng C.L., Lu C.-M., Russell C.G., and Chittu K.K. (2001). DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (6): 8955-8960.
  156. McEvoy, L.M. (1996). *In vitro* assays of leukocyte-endothelial adhesion. In: Herzenber, L.A., and D.M. Weir (Eds). *Weir's handbook of experimental immunology* Vol. II. Blackwell Science Australia. 70.1-70.7.
  157. Michalides, R., Kwa B., Springali D., Van Zandwijk N., Koopman J., Hiljems J., and Mooi W. (1994). NCAM and lung cancer. *Int J Cancer Suppl* 8: 49-52.
  158. Mignatti, P., and Rifkin D.B. (1993). Biology and biochemistry of proteases in tumor invasion. *Physiol Rev* 73: 161-195.
  159. Mizejewski, G.J. (1999). Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 124-138.
-

- 
160. Montes-Sánchez, D.G. (2003). Caracterización de la adhesión celular entre células tumorales y endoteliales activadas *in vitro*. Tesis de Maestría. UAM-Iztapalapa. 83 pp.
161. Mortimore, G.E., and Tietze F. (1959a). Studies on the mechanism of capture and degradation of insulin- $I^{131}$  by the cyclically perfused rat liver. *Ann NY Acad Sci* 82: 329-337.
162. Mortimore, G.E., Tietze F., and Stetten D. (1959b). Metabolism of insulin- $I^{131}$ . *Diabetes* 8(4): 307-314.
163. Mortimore, G.E. (1961). Effects of insulin on potassium transfer in isolated rat liver. *Am J Physiol* 200(6): 1315-1319.
164. Mulivor, A.W., and Lipowsky H.H. (2002). Role of lycocalix in leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am J Physiol* 283: H1282-H1291.
165. Müller, K.-M., and Respondek M. (1990). Pulmonary metastases: pathology anatomy. *Lung Suppl*: 1137-1144.
166. Müller, A., Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M.E., McClanahan T., Murphy E., Yuan W., Wagner S.N., Barrera J.L., Mohar A., Verástegui E., and Zlotnik A. (2001). Involvement of chemokine receptor in breast cancer metastasis. *Nature* 410: 50-56.
167. Nelson, A.R., Fingleton B., Rothenberg M.L., and Matrisian L.M. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18: 1135-1149.
168. Nicolson, G.L. (1987). Tumor cell instability, diversification, and progression to the metastatic phenotype: from oncogene to oncofetal expression. *Cancer Res* 47: 1473-1487.
169. Okada, O., Presson Jr R.G., Godbey P.S., Capen R.L., and Wagner Jr W.W. (1994). Temporal capillary perfusion patterns in single alveolar walls. *J Apply Physiol* 76: 380-386.
170. Orosz P., Echtenacher B., Falk W., Rüschoff J., Weber D., and Männel D.N. (1993). Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 177: 1391-1398.
171. Orr, F.W., Wang H.H., Lafrenie R.M., Scherbarth S., and Nance D.M. (2000). Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol* 190: 310-329.
172. Orr, F.W., and Wang H.H. (2001). Tumor cell interactions with the microvasculature: a rate-limiting step in metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* 10: 357-381.
-

- 
173. Owen, R.L., and D.K. Bhalla (1983). Lympho-epithelial organs and lymph nodes In: Hodges, G.M., and K.E. Carr, Eds. Biomedical Research Applications of Scanning Electron Microscopy, Vol. 3. Academic Press, UK. 79-169.
174. Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1: 571-573.
175. Papaikonomou, E. (1977). Rat adrenocortical dynamics. *J Physiol* 265: 119-131.
176. Paris, S., Chauzy C., Martin-Vandelet N., Delpech B., Thiberville L., Martin J.-P., and Diarra-Mehrpour M (1999). A model of spontaneous lung metastases visualized in fresh host tissue by green fluorescent protein expression. *Clin Exp Metastasis* 17: 817-822.
177. Patel, K.D., Zimmerman G.A., Prescott S.M., McEver R.P., and McIntyre T.M. (1991). Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol* 112: 749-759.
178. Patton, J.T., Menter D.G., Benson D.M., Nicolson G.L., and McIntire L.V. (1993). Computerized analysis of tumor cells flowing in a parallel plate chamber to determine their adhesion stabilization lag time. *Cell Motil Cytoskeleton* 26: 88-98.
179. Pennacchietti, S., Michieli P., Galluzo M., Mazzone M., Giordano S., and Comoglio P.M. (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 3(4): 347-61.
180. Perl, A.-K., Dahl U., Wilgenbus P., Cremer H., Semb H., and Christofori G. (1999). Reduced expression of neural cell adhesion molecule induces metastatic dissemination of pancreatic  $\beta$  tumor cells. *Nat Med* 5: 286-291.
181. Plantefaber, L.C., and Hynes R.O. (1989). Changes in integrin receptors on oncogenically cells. *Cell* 56: 281-290.
182. Poste, G., and Fidler I.J. (1980). The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283: 139-146.
183. Pu, F.R., Williams R.L., Markkula T.K., and Hunt J.A. (2002). Expression of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules on monocyte adhesion to human endothelial cells on plasma treated PET and PTFE *in vitro*. *Biomaterials* 23: 4705-4718.
184. Pries, A.R., Neuhaus D., and Gaehtgens P. (1992). Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit. *Am J Physiol* 263: H1770-1778.
185. Pries, A.R., Secomb T.W., and Gaehtgens P. (2000). The endothelial surface layer. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 440: 653-666.

186. Rafii, S., Heissig B., and Hattori K. (2002). Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther* 9(10): 631-641.
187. Ramaswamy, S., Ross K.N., Lander E.S., and Golub T.R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33: 49-54.
188. Rasmussen, K. (1987). Quantitative blood flow in the fetal descending aorta and in the umbilical vein in normal pregnancies. Longitudinal and cross-sectional studies. *Scand J Clin Lab Invest* 47: 319-324.
189. Renkonen, R., Mattila P., Majuri M.-L., Rübina J., Toppila S., Renkonen J., Hirvas L., Niittymäki J., Turunen J.P., Renkonen O., and Paavonen T. (1997). *In vitro* experimental studies of sialyl Lewis x and sialyl Lewis a on endothelial and carcinoma cells: crucial glycans on selectin ligands. *Glycocoj J* 14: 593-600.
190. Resnick, N., and Gimbrone Jr. M.A. (1995). Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J* 9: 874-882.
191. Rinker, K.D., Prabhakar V., and Truskey G.A. (2001). Effect of contact time and force on monocyte adhesion to vascular endothelium. *Biophys J* 80: 1722-1732.
192. Roldan, A.L., Cubellis M.V., Masucci M.T., Behrendt N., Lund L.R., Dano K., Apella E., and Blasi F. (1990). Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J* 9: 467-474.
193. Romanov, Y.A., Balyasnikova I.V., Bystrevskaya V.B., Byzova T.V., Ilyinskaya O.P., Krushinsky A.V., Latsis R.V., Soboleva E.L., Tararak E.M., and Smirnov V.N. (1995). Endothelial heterogeneity and intimal blood-borne cells. Relation to human atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 748: 12-37 (discussion 37-39).
194. Rosales, C., O'Brien V., Kornberg L., and Juliano R.L. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim Biophys Acta* 1242: 77-98.
195. Royal, J.A., and Ischiropoulos H. (1993). Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophysics* 302(2): 348-355.
196. Rutishauser, U. (1996). Polysialic acid and the regulation of cell interactions. *Curr Opin Cell Biol* 8: 679-684.
197. Saito, K., Nagashima M., Iwata M., Hamada H., Sumiyoshi K., Takada Y., and Takada A. (1990). The concentration of tissue plasminogen activator and urokinase in plasma and tissue patients with ovarian and uterine tumors. *Thromb Res* 58: 355-366.

- 
198. Saksela, O., and Rifkin D.B. (1988). Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Ann Rev Cell Biol* 4: 93-126.
  199. Schackert, G., and Fidler I.J. (1988). Site-specific metastasis of mouse melanomas and a fibrosarcoma in the brain or meninges of syngeneic animals. *Cancer Res* 48: 3478-3484.
  200. Sears, F.W., and Zemansky M.W. (1979). *Física General*. 5ª edición. Aguilar. Madrid, España. 1056 pp.
  201. Secretaría de Salud (SSA), México ([www.ssa.gob.mx](http://www.ssa.gob.mx)).
  202. Sibley, C.P., and Whitehouse B.J. (1979). Perfusion of the rat adrenal cortex *in situ*. *J Physiol* 279: 21P-22P.
  203. Silvestro, L., Ruikun C., Sommer F., Duc T.M., Biancone L., Montrucchio G., and Camusii G. (1994). Platelet-activating factor induced endothelial cell expression of adhesion molecules and modulation of surface glycocalix, evaluated by electron spectroscopy chemical analysis. *Semin Thromb Hemost* 20: 214-222.
  204. Simiantonaki, N., Jayasinghe C., and Kirkpatrick C.J. (2002). Effect of pro-inflammatory stimuli on tumor cell-mediated induction of endothelial cell adhesion molecules *in vitro*. *Exp Mol Pathol* 73: 46-53.
  205. Sinley, C.P., and Whitehouse B.J. (1979). Perfusion of the rat adrenal cortex *in situ*. *J Physiol* 291: 21P-22P.
  206. Sporn, M.B. (1996). The war on Cancer. *Lancet* 347(9012): 1377-1381.
  207. Stetler-Stevenson, W.G., and Yu A.E. (2001). Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Sem Cancer Biol* 11: 143-152.
  208. Stoelcker, B., Hafner M., Orosz P., Nieswandt B., and Männel D.N. (1996). Role of adhesion molecules and platelets in TNF-induced adhesion of tumor cells to endothelial cells: implications for experimental metastasis. *J Inflamm* 46: 155-167.
  209. Stoppelli, M.P., Corti A., Soffientini A., Cassani G., Blasi F., and Assoian R.K. (1985). Differentiation enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4939-4943.
  210. Strathdee, G. (2002). Epigenetic *versus* genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Sem Cancer Biol* 12: 373-379.
  211. Suematsu, M., Kato S., Ishii H., Asako H., Yanagisawa T., Suzuki H., Oshio C., and Tsuchiya M. (1991). Intralobular heterogeneity of carbon tetrachloride-induced oxidative stress in perfused rat liver visualized by digital imaging fluorescence microscopy. *Lab Invest* 64: 167-173.
-

212. Suematsu, M., Schmid-Schönbein G.W., Chavez-Chavez R.H., Yee T.T., Tamatani T., Miyasaka M., Delano F.A., and Zweifach B.W. (1993). *In vivo* visualization of oxidative changes in microvessels during neutrophil activation. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 264: H881-891.
213. Sugarbaker, E.V. (1979). Cancer metastasis: a product of tumor-host interactions. *Curr Probl Cancer* 3: 1-59.
214. Sugino, T., Kusakabe T., Hoshi N., Yamaguchi T., Kawaguchi T., Goodison S., Sekimata M., Homma Y., Suzuki T. (2002). An invasion-independent pathway of blood-borne metastasis: a new murine mammary tumor model. *Am J Pathol* 160(6): 1973-1980.
215. Tamaki, M., Acyagi M., Morita Z., Hirakawa K., and Murota S. (1995). Cell adhesion molecules acting between C6 glioma and endothelial cells. *J Neurocol* 24: 283-286.
216. Tang, D.G., Timar J., Grossi I.M., Renaud C., Kimler V.A., Diglio C.A., Taylor J.D., and Honn K.V. (1993). The lipoxygenase metabolite, 12(S)-HETE, induces a protein kinase C-dependent cytoskeletal rearrangement and retraction of microvascular endothelial cell. *Exp Cell Res* 207: 361-375.
217. Tang, D.G., Diglio C.A., and Honn K.V. (1994). Activation of microvascular endothelium by eicosanoid 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid leads to enhanced tumor cell adhesion via up-regulation of surface expression of  $\alpha v\beta 3$  integrin: a posttranscriptional, protein kinase C- and cytoskeleton-dependent process. *Cancer Res* 54: 1119-1129.
218. Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442-454.
219. Thorlacius, H., Prieto J., Raud J., Gautam N., Patarroyo M., Hedqvist P., and Lindbom L. (1997). Tumor cell arrest in the microcirculation: lack of evidence for a leukocyte-like rolling adhesive interaction with vascular endothelium *in vivo*. *Clin Immunol Immunopathol* 83(1): 68-76.
220. Topper, J.N., Cai J., Falb D., and Gimbrone Jr. M.A. (1996). Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10417-10422.
221. Tözeren, A., Kleinman H.K., Grant D.S., Morales D., Mercurio A.M., and Byers S.W. (1995). E-selectin-mediated dynamic interactions of breast and colon-cancer cells with endothelial-cell monolayers. *Int J Cancer* 60: 426-431.

- 
222. Ueda, H., Ueda K., Baba T., and Ohno S. (2001). Delta- and  $\gamma$ -sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *J Histochem Cytochem* 49: 529-538.
223. van't Veer, L.J., Dal H., van de Vijver M.J., He Y.D., Hart A.A.M., Mao M., Peterse H.L., van der Kooy K., Marton M.J., Witteveen A.T., Schreiber G.J., Kerkhoven R.M., Roberts C., Linsley P.S., Bernards R., and Friend S.H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530-536.
224. Varner, J.A., Emerson D.A., and Juliano R.L. (1995). Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* 6: 725-740.
225. Varner, J.A., and Cheresh D.A. (1996). Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 8: 724-730.
226. Vassalli, J.D., Baccino D., and Belin D. (1985). A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J Cell Biol* 100: 86-92.
227. Vestweber, D. (2002). Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Curr Opin Cell Biol* 14: 587-593.
228. Vidal-Vanaclocha, F., Fantuzzi G., Mendoza L., Fuentes A.M., Anasagasti M.J., Martín J., Carrascal T., Walsh P., Reznikov L.L., Kim S.-H., Novick D., Rubinstein M., and Dinarello C.A. (2000). IL-18 regulates IL-1 $\beta$ -dependent hepatic melanoma Metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2): 734-739.
229. Vogel, S. (1996). *Life in moving fluids: The physical biology of flow*. 2nd edition. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
230. Voet, D., and Voet J.G. (1995). *Biochemistry*. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley and Sons, USA. 1360 pp.
231. von Tempelhoff, G.F., Heilmann L., Hommel G., Schneider D., Niemann F., and Zoller H. (1998). Hyperviscosity syndrome in patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 82(6): 1104-1111.
232. von Tempelhoff, G.F., Nieman F., Heilmann L., and Hommel G. (2000). Association between blood rheology, thrombosis and cancer survival in patients with gynecologic malignancy. *Clin Hemorheol Microcirc* 22(2): 107-130.
233. von Tempelhoff, G.F., Schonmann N., Heilmann L., Pollow K., and Hommel G. (2002) Prognostic role of plasmaviscosity in breast cancer. *Clin Hemorheol Microcirc* 26(1): 55-61.
-

- 
234. von Tempelhoff, G.F., Heilmann L., Hommel G., and Pollow K. (2003). Impact of rheological variables in cancer. *Semin Thromb Hemost* 29(5): 499-513
235. van Ewijk, W., N.H.C. Brons, and J. Rozing (1975). Scanning electron microscopy of homing and recirculating lymphocyte populations. *Cellular Immunol* 19: 245-261.
236. von Adrian, U.H., S.R. Hassien, R.D. Nelson, S.L. Erlandsen, and E.C. Butcher (1995). A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* 82: 989-999.
237. von Segesser, L.K. (1997). Perfusion education and certification in Europe. *Perfusion* 12: 243-246.
238. Voura, E.B., Sandig M., Kalnins V.I., and Siu C.-H. (1998a). Cell shape changes and cytoskeleton reorganization during transendothelial migration of human melanoma cells. *Cell Tissue Res* 293: 375-387.
239. Voura, E.B., Sandig M., and Siu C.-H. (1998b). Cell-cell interactions during transendothelial migration of tumor cells. *Microsc Res Tech* 43: 265-275.
240. Voura, E.B., Ramjeesingh R.A., Montgomery A.M.P., and Siu C.-H. (2001). Involvement of integrin  $\alpha\beta 3$  and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Cell Biol* 12: 2699-2710.
241. Wagner Jr, W.W., Todoran T.M., Tanabe N., Wagner T.M., Tanner J.A., Glennly R.W., and Presson Jr R.G. (1999). Pulmonary capillary perfusion: intra-alveolar fractal patterns and interalveolar independence. *J Apply Physiol* 86(3): 825-831.
242. Waller, A.D., and Waymouth R.E. (1887). *Phil Trans R Soc* 178: 216-242.
243. Weidner, N. (2002). New paradigm for vessel intravasation by tumor cells. *Am J Pathol* 160(6): 1937-1939.
244. Weiss, L., and Ward P.M. (1983). Cell detachment and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2: 111-127.
245. Weiss, L., Orr F.W., and Honn K.V. (1988). Interactions of cancer cells with the microvasculature during metastasis. *FASEB J* 2: 12-21.
246. Weiss, L. (1989). Biomechanical destruction of cancer cells in skeletal muscle: a rate-regulator for hematogenous metastasis. *Clin Exp Metastasis* 7(5): 483-491.
247. Wiczorek, K.M., Brewer A.S., and Myatt L. (1995). Shear stress may stimulate release and action of nitric oxide in the human fetal-placental vasculature. *Am J Obstet Gynecol* 173: 708-713
-

248. Wenk, E.J., D. Orlic, E.J. Reith, and J.A.G. Rhodin (1974). The ultrastructure of mouse lymph node venules and the passage lymphocytes across their walls. *J Ultrastructure Res* 47: 214-241.
249. Werb, Z. (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91: 439-442.
250. Wyckoff, J.B., Jones J.G., Condeelis J.S., and Segall J.E. (2000). A critical step in metastasis: *in vivo* analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res* 60: 2504-2511.
251. World Health Organization ([www.who.int](http://www.who.int)).
252. Yamamoto, M., Mohanam S., Sawaya R., Fuller G.N., Seiki M., Sato H., Gokaslan Z.L., Liotta L.A., Nicolson G.L., and Rao J.S. (1996). Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res* 56: 384-392.
253. Yang, M., Jiang P., An Z., Baranov E., Li L., Hasegawa S., Al-Tuwajiri M., Chishima T., Shimada H., Moossa A.R., and Hoffman R.M. (1999). Genetically fluorescent melanoma bone and organ metastasis models. *Clin Cancer Res* 5: 3549-3559.
254. Yang, M., Baranov E., Wang J.-W., Jiang P., Wang X., Sun F.-X., Bouvet M., Moossa A.R., Penman S., and Hoffman R.M. (2002). Direct external imaging of nascent cancer, tumor, progression, angiogenesis, and metastasis on internal organs in the fluorescent orthotopic model. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (6): 3824-3829.
255. Yoshioka, T., Masuko T., Kotanagi H., Aizawa O., Saito Y., Nakasato H., Koyama K., and Hashimoto Y. (1998). Homotypic adhesion through carcinoembryonic antigen plays a role in hepatic metastasis development. *Jpn J Cancer Res* 89: 177-185.